Sinalização Purinérgica: Implicações Fisiopatológicas

Organizadores:
Andréia Machado Cardoso
Leandro Henrique Manfredi
Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

Sinalização Purinérgica: Implicações Fisiopatológicas

Organizadores:
Andréia Machado Cardoso
Leandro Henrique Manfredi
Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

Dedicamos a todos os pesquisadores que tenham como
área de interesse a sinalização purinérgica.

Dedicamos aos nossos familiares, mestres e amigos por
incentivarem, compreenderem e apoiarem nossa trajetória como
professores e pesquisadores.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos:

Aos autores dos capítulos que compõem esta obra, pela dedicação e qualidade empregada em cada frase escrita.

Aos nossos mestres e colegas que nos incentivaram e nos auxiliaram a pesquisar sobre a sinalização purinérgica e a compreender que se trata de uma área promissora para desenvolvimento científico da área da saúde.

Aos nossos estudantes de graduação/iniciação científica que ansiavam por fontes didáticas escritas em língua portuguesa sobre a sinalização purinérgica, os quais foram a mola propulsora para que esta obra fosse iniciada.

À Editora da Universidade Federal da Fronteira Sul e à própria UFFS por viabilizarem a publicação e divulgação deste livro.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."
(Arthur Schopenhauer)

PREFÁCIO

Se hoje sabemos que o ATP, a famosa moeda energética, é liberado das células e aceitamos esse conceito com total tranquilidade, devemos essa descoberta a um grande pesquisador chamado Geoffrey Burnstock. Na década de 70, quando era quase uma heresia propor um papel extracelular para o ATP, ele foi capaz de acreditar nas evidências obtidas em seu laboratório, bem como aquelas encontradas na literatura, e, assim, propor a hipótese da neurotransmissão não colinérgica e não adrenérgica por ele denominada de transmissão purinérgica (*Purinergic nerves, Burnstock, G. Pharmacological Reviews 24(3):509-581, 1972*). A partir dos trabalhos originais de Burnstock, o interesse pela sinalização purinérgica foi ganhando força, e o número de artigos publicados em diferentes sistemas e tipos celulares cresceu exponencialmente até os dias de hoje.

Uma breve revisão da literatura nos mostra também que os componentes desse sistema foram sendo identificados durante esses últimos 50 anos até que o quadro mais completo, porém certamente inacabado, identificou: i) os mecanismos de liberação do ATP das células; ii) um número bastante complexo de receptores (P1, P2) e seus subtipos; iii) as vias de sinalização intracelulares que conectam esses receptores e seus agonistas ao metabolismo intracelular; iv) o sistema altamente eficiente de degradação do ATP constituído por várias classes de enzimas; v) os transportadores que possibilitam a via de recuperação das purinas.

A proposta deste livro, organizado pela bela inciativa dos professores Andréia Machado Cardoso, Leandro Henrique Manfredi e Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel, com a participação de colaboradores, é fazer uma breve revisão dessa história científica e apresentar alguns tópicos sobre os mais recentes achados da sinalização purinérgica em diferentes sistemas em condições fisiológicas e patológicas.

Fazendo parte dessa história, poderíamos citar muitos pesquisadores, mas três deles – José Marcos Ribeiro, João José Freitas Sarkis (*in memoriam*) e Pedro Muanis Persechini (*in memoriam*) – merecem destaque especial. Esse destaque se dá pela importância de seus trabalhos precursores sobre a sinalização purinérgica no Brasil e pela formação de professores e pesquisadores que levaram adiante os estudos sobre esse sistema tanto aqui, no Brasil, como no mundo.

Profa. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini
Presidente do Clube Brasileiro de Purinas (2018-2021)

APRESENTAÇÃO

O conceito de um sistema de sinalização purinérgica foi proposto pela primeira vez pelo professor Geoffrey Burnstock há mais de 40 anos. Esse sistema inclui as respostas celulares aos nucleotídeos, como o ATP, e aos nucleosídeos, como a adenosina, os quais agem como mensageiros extracelulares por meio de receptores específicos em todos os órgãos e sistemas. Todas as células possuem componentes do sistema purinérgico e tem a capacidade de liberar nucleotídeos de uma forma controlada. Os mecanismos relacionados à liberação dos nucleotídeos tem sido foco intenso de atividades de pesquisa. Estudos têm investigado amplamente a fisiologia, a farmacologia e a bioquímica da sinalização purinérgica. Mais recentemente, o foco tem sido a patofisiologia e o potencial terapêutico dos componentes do sistema purinérgico, especialmente em relação aos receptores P1 e P2. É estabelecido, atualmente, que mudanças na sinalização purinérgica estão envolvidas na patofisiologia e na terapêutica de muitas doenças, possivelmente, além de estarem relacionadas aos efeitos do exercício físico e de moléculas nutracêuticas sobre o organismo.

No Brasil, existem diversos grupos de pesquisa que têm como foco a investigação da sinalização purinérgica. Contudo, o conhecimento sobre a sinalização purinérgica tem sido amplamente difundido em língua inglesa por meio de publicações científicas em periódicos internacionais. Em língua portuguesa, os estudos sobre o sistema purinérgico vêm sendo publicados, principalmente, em dissertações e em teses. Esses dois fatores podem representar uma barreira para o acesso a esse conhecimento, fato que se consolidou como a principal motivação dos organizadores deste livro para produzi-lo.

Dessa forma, o propósito desta obra é poder compilar e difundir em língua portuguesa um pouco do conhecimento disponível a respeito do sistema purinérgico. Todos os colaboradores do livro são pesquisadores brasileiros que estudam alguma situação fisiológica ou patológica envolvendo esse sistema. Destacamos

que esta produção conta com a colaboração de pesquisadores brasileiros renomados na área, como as professoras Ana Maria Oliveira Battastini e Maria Rosa Chitolina Schetinger e o professor Robson Coutinho-Silva.

O livro inicia com três capítulos introdutórios, que contam sobre o funcionamento da sinalização purinérgica em condições fisiológicas gerais e sobre a história das enzimas e dos receptores purinérgicos. Os dois capítulos subsequentes abordam situações fisiológicas, como a modulação do sistema purinérgico pelo exercício físico e por moléculas nutracêuticas. Os capítulos seguintes abordam a relação da sinalização purinérgica em condições patológicas, incluindo diversos tipos de câncer, doenças endócrinas, como diabetes e disfunções da glândula tireoide, doença renal, hipertensão arterial sistêmica, doenças degenerativas, como doença de Alzheimer, e doença macular relacionada à idade, doenças parasitárias e virais, dentre outras.

Dessa forma, este livro foi produzido para trazer aos leitores os últimos achados em relação ao envolvimento da sinalização purinérgica em diversas condições fisiológicas e patológicas. Espera-se contribuir para a difusão do conhecimento sobre os componentes do sistema purinérgico e sua atuação, bem como para a formação de novos pesquisadores que tenham esse tema como foco de suas pesquisas.

Andréia Machado Cardoso
Leandro Henrique Manfredi
Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel
(Organizadores)

LISTA DE ABREVIAÇÕES

(+) ssRNA: RNA de cadeia simples e senso positivo
[Ca2+]cit: concentração de cálcio citoplasmático
5'-AMPc: 3'-5'-monofosfato de adenosina cíclico
5-NT: 5' nucleotidase
A2A: receptores metabotrópicos P1 do subtipo 2A
A2B: receptores metabotrópicos P1 do subtipo 2B
A3R: receptor de adenosina A3
AC10: adenilil ciclase 10
Ach: acetilcolina
Acrs: apyrase conserved regions
ADA: adenosina desaminase
ADO: adenosina
ADP: adenosina difosfato
ADPβs: agonista do receptor P2Y1
AGE: produtos de glicação avançada
AGL: ácidos graxos livres
AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês Acquired immunodeficiency syndrome
AJCC: American Joint Committee on Cancer
AKT: proteína quinase B
AMP: adenosina monofosfato
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC: gene da polipose adenomatosa coli
APP: proteína precursora amiloide
Atg5: autophagyrelated5
ATP: adenosina trifosfato
Atpys: adenosina 5'-O-(3-Tio)trifosfato
AVC: acidente vascular cerebral
Azga: transportadores específicos para adenina-hipoxantina-guanina
Aβ: beta amiloide
BAX: proteína X associada ao BCL-2
BBG: do inglês antagonista brilliant blue G
Bcl-2: B-celllymphomaprotein2
B-LLC: leucemia linfocítica crônica de células B
BLS: biópsia de linfonodo sentinela
BRAF: proto-oncogene B-Raf
Bz-ATP: 2'(3')-O-(4-Benzoilbenzoil)adenosina 5'-trifosfato trimetilamônio
Ca2+: íon cálcio
Cam: calmodulina
Camkii: Ca²/calmodulina
CAT: catalase
CCR: câncer colorretal
CCR5: C-C receptor de quimiocina tipo 05 de células T
CCU: câncer de colo uterino
CD: células dendríticas
CD34: marcador de superfície de células hematopoéticas
CD38: grupamento de diferenciação 38
CD39: ectonucleosídeo trifosfato-difosfoidrolase1
CD4: grupamento de diferenciação tipo 4, do inglês Cluster of differentation, Linfócito T auxiliar
CD45: marcador de superfície de leucócitos
CD73: ecto-5'-nucleotidase
CD8: grupamento de diferenciação tipo 8, Linfócito T citotóxico
CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês Center for Disease Control
CDK4: cyclin-dependent kinase 4
CDKN2A: cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CEA: antígeno carcinoembrionário
CK: creatina quinase
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
CLP: do inglês puncture and cecal ligation
CM: câncer de mama
CO2: dióxido de carbono
CPNPC: carcinoma pulmonar de não pequenas células
CPPC: carcinoma pulmonar de pequenas células
CRE: elementos de resposta à camp
CTH: célula-tronco hematopoética
CXCL10/IP-10: interferon gama induzido por proteína 10
CXCL12: quimiocina CXC 12

CXCR4: C-X-C receptor de quimiocina tipo 04 de macrófagos
CXCR4: quimiocinas CXC do tipo 4
DA: doença de Alzheimer
DAMP: padrão molecular associado ao dano
Datp: desoxiadenosina trifosfato
DC-SIGN: do inglês dendritic cell–specific intercellular adhesion molecule-3–grabbing nonintegrin
DENV: vírus da dengue
DM: diabetes mellitus
DMG: diabetes mellitus gestacional
DMRI: degeneração macular relacionada à idade
DNA: ácido desoxirribonucleico
DRC: doença renal crônica
E-5'-NT: ecto-5'-nucleotidase
ECG: eletrocardiograma
EC: células epiteliais e endoteliais normais
Ecto-5'-NT: ecto-5'-nucleotidase
EDHF: fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico
EKS: quinases reguladas por sinais extracelulares
EML4-ALK: echinoderm microtubule associated protein-like 4-anaplastic lymphomakinase
END: células endotelias
E-NDPK: ectonucleosídeo-difosfoquinase
E-NPP: ecto-nucleotídeo pirofosfato/fosfodiesterase
ENPP1: ecto-nucleotídeo pirofosfatase
ENT1 e 2: equilibrative nucleoside transporter
ENTPD1: ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1
Entpdase/CD39/ntpdase1: ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase
E-ntpdase: ecto-nucleosídeo-trifosfo-difosfoidrolases
EPAC-1: proteína de troca diretamente ativada pelo AMPc
EPR: epitélio pigmentar da retina
ER: espécies reativas
ERK: quinase regulada por sinal extracelular
ERK1: quinase reguladora de sinais extracelulares 1
ERK2: quinase reguladora de sinais extracelulares 2
Eros: espécies reativas ao oxigênio
EUA: Estados Unidos da América
FAL: fosfatase alcalina
FDA: Food and Drug Administration
FG: filtração glomerular
GLUT 2: transportador de glicose tipo 2
GLUT4: transportador de glicose 4
Gp120: glicoproteína tipo 120
Gp41: glicoproteína tipo 41
GPX: glutationa peroxidase
GSK3: glicogênio sintase cinase 3
H2O2: peróxido de hidrogênio
HAART: terapia antirretroviral de alta atividade, do inglês highly activity antiretroviral therapy
Hba1c: hemoglobina glicosilada
HER2: receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
HIF1α: fator induzível por hipóxia-1α
HIIT: exercício intermitente de alta intensidade
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HIV-1: vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HMEC: células epiteliais mamárias humanas benignas
HMGB1: proteína do grupo de alta mobilidade B1
HO-1: enzima heme oxigenase 1
HR: receptor de hormônio
HSP: proteoglicano de heparan sulfato
Hsp70: heat shock protein
HT-29: células de adenocarcinoma colorretal com morfologia epitelial
HTN: hipertensão
HT: hormônios tireoidianos
HUVEC: células endoteliais da veia umbilical humana
IB-MECA: adenosina-5'-N-metiluronamida
IFN-γ: interferon gama
IGF: fator de crescimento semelhante a insulina
Igg: imunoglobulina G
Igm: imunoglobulina M
IHQ: imuno-histoquímica
IL: interleucina
IL-1: interleucina 1
IL-10: interleucina 10
IL-12: interleucina do tipo 12
IL-15: interleucina 15
IL-18: interleucina do tipo 18
IL-1β: interleucina 1 beta
IL-1RA: antagonista do receptor de interleucina 1
IL-1β: interleucina 1β
IL-2: interleucina 2
IL-6: interleucina 6
IL-8: interleucina 8
ILAS: Instituto Latino Americano de Sepse
Insp3: inositol 1,4,5 trifosfato
IP3: inositol 1,4,5 trifosfato

IP3R: receptor de inositol trifosfato
IRA: insuficiência renal aguda
KRAS: oncogene Kirsten Rat Sarcoma
LDH: lactato desidrogenase
LDL: lipoproteínas de baixa densidade
LLA: leucemia linfoblástica aguda
LLC: leucemia linfoide crônica
LMA: leucemia mieloide aguda
LPS: lipopolissacarídeo
LS: linfonodo sentinela
LT: linfócito T
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
MB: membrana de Bruch
MC: melanoma cutâneo
MC1R: receptor de melanocortina 1
MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1
MEK: quinase ativadora da MAP quinase
MES: melanoma extensivo superficial
MIF: fator de inibição de migração de macrófagos
Mir-21: microrna-21
ML: músculo liso
MLA: melanoma lentiginoso acral
MLM: melanoma lentigo maligno
mRNA: RNA mensageiro
MRS2578: 1,4-di-(feniltioureido) butano
Mtor: alvo mamífero da rapamicina
Na/K atpase: bomba de sódio-potássio
NAD: nicotinamida adenina dinucleotideo, do inglês nicotinamide adenin dinucleotide
NAD+: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADP+: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAT: nucleobase cation symporters
NC: proteína do nucleocapsídeo
NECA: 5'-nucleotidase-etilcarboxamidoadenosina
NF279: antagonista dos receptores P2X1 e P2X7
NFAT: fator nuclear de células T ativadas
Nfp2x7: receptor P2X7 não funcional
NF-κb: fator de transcrição nuclear kappa B
NIC: neoplasias intraepiteliais
NK: células natural killer
NLRP3: gene codificador de inflamassoma
NO: óxido nítrico
NOD: camundongos diabéticos não-obesos
NPP: nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
NRAS: neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NS: proteína não estrutural
NSC1: nucleobase cation symporters
NTA: necrose tubular aguda
Ntpdase1: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase -1
Ntps/ndps: nucleosídeos trifosfatados e difosfatados
O2 •-: ânion radical superóxido
O2: oxigênio
OH•: radical hidroxila
OMS: Organização Mundial da Saúde
ON: óxido nítrico
P1: purinoreceptores tipo 1
P2: purinoreceptores tipo 2
P2X: purinoreceptores ionotrópicos P2
P2X1: purinoreceptores P2X subtipo 1
P2X4: purinoreceptores P2X subtipo 4
P2X4R: receptor P2X4
P2X7: purinoreceptores P2X subtipo 7
P2X7R: receptor P2X7
P2Y: purinoreceptores metabotrópicos P2
P2Y1: purinoreceptores P2Y subtipo 1
P2Y11: purinoreceptores P2Y subtipo 11
P2Y12: purinoreceptores P2Y subtipo 12
P2Y2: purinoreceptores P2Y subtipo 2
P2Y6: purinoreceptores P2Y subtipo 6
PA: pressão arterial
Panx-1: panexina-1
PCR: proteína C-reativa
PD: pressão diastólica
PGI2: prostaciclina
Pgs: prostaglandinas
Pi: fosfato inorgânico
PI3KCA: fosfatidilinositol 3-quinase
PKA: proteína quinase A
PKC: proteína cinase C
PLC: fosfolipase C
Pnx1: hemicanais da panexina 1
Prm/M: proteína de membrana
PS: pressão sistólica
Pyk2: tirosina cinase 2
RAGE: receptores para AGE
RB1: retinoblastoma1
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
Rdrp: polimerase de RNA dependente de RNA
RE: receptor de estrogênio
Rho: pequena gtpase pertencente à famílias Ras
RL: radicais livres
RNA: ácido ribonucleico
RNAm: ácido ribonucleico mensageiro
ROCK: Rho quinase

ROS: espécies reativas de oxigênio
RP: receptor de progesterona
RS: retículo sarcoplasmático
RT-qpcr: PCR quantitativa em tempo real
SA: sinoatrial
SMAD2: mães contra decapentaplégico homólogo 2
SMAD4: mães contra decapentaplégico homólogo 4
SNC: sistema nervoso central
SNP: sistema nervoso periférico
SNP: polimorfismo de nucleotídeo único
SOD: superóxido dismutase
SP: sistema purinérgico
SPM: síntese de proteína muscular
STZ: estreptozotocina
T3: triiodotireonina
T4: tiroxina
TERT: telomerase reverse transcriptase
TGF-β: fator de transformação de crescimento beta
TGF-β1: fator de transformação do crescimento beta 1
Th1: linfócitos T auxiliares tipo 1, produtores de resposta inflamatória
Th17: linfócitos T auxiliares tipo 17, secretores de IL-6 e IL-8
Th2: linfócitos T auxiliares tipo 2, atuante em defesa parasitária e alérgica
Tlrs: receptores Toll like
TNF-α: fator de necrose tumoral alfa
TNM: classificação de tumores malignos
TOTG: teste oral de tolerância à glicose
TP53: gene da proteína tumoral P53
TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg: linfócitos T regulatórios
TRH: hormônio liberador de tireotrofina
TSH: hormônio estimulante da tireoide
Uapa/C: transportadores específicos de ácido úrico e xantina
UDP: uridina difosfato
UMP: uridina monofosfato
UTI: Unidade de Terapia Intensiva
UTP: trifosfato de uridina
UV: raios ultravioletas
UVR: radiação ultravioleta
VEGFR: fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E SUAS IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS

Andréia Machado Cardoso
Roselia Maria Spanevello
Leandro Henrique Manfredi
Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

Há mais de 40 anos, o conceito de um sistema de sinalização purinérgica foi proposto pela primeira vez pelo professor Geoffrey Burnstock (1972). Esse sistema possui diversos componentes, dentre eles estão algumas enzimas, algumas moléculas e diversos receptores. A sinalização purinérgica inclui as respostas celulares aos nucleotídeos, como o ATP, e aos nucleosídeos, como a adenosina, os quais agem como mensageiros extracelulares por meio de receptores específicos em todos os órgãos e sistemas. Todas as células possuem componentes do sistema purinérgico e têm a capacidade de liberar nucleotídeos de uma forma controlada. Os mecanismos relacionados à liberação dos nucleotídeos têm sido foco intenso de atividades de pesquisa. Estudos têm investigado amplamente a fisiologia, a farmacologia e a bioquímica da sinalização purinérgica. Mais recentemente, o foco tem sido a patofisiologia e o potencial terapêutico dos componentes do sistema purinérgico, especialmente em relação aos receptores P1 e P2. Atualmente, é estabelecido que mudanças na sinalização purinérgica estão envolvidas na patofisiologia e, possivelmente, na terapêutica de muitas doenças, além de estarem relacionadas aos efeitos do exercício físico e de moléculas nutracêuticas sobre o organismo.

Dessa forma, este capítulo introdutório objetiva explanar sobre os componentes da sinalização purinérgica, bem como suas funções em condições fisiológicas

gerais. Os capítulos subsequentes abordarão a sinalização purinérgica em duas situações específicas (exercício e nutrição), e os outros capítulos tratarão do envolvimento desse sistema em mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças, bem como seu potencial como alvo para intervenções terapêuticas.

O SISTEMA PURINÉRGICO: MOLÉCULAS, RECEPTORES E ENZIMAS

O sistema purinérgico é composto por: as moléculas sinalizadoras, que são os nucleotídeos e nucleosídeos; os receptores, através dos quais essas moléculas se ligam e exercem suas funções; e as enzimas responsáveis pela geração, reconhecimento e degradação daquelas moléculas sinalizadoras.

A adenosina trifosfato (ATP) é a molécula mais conhecida, devido à sua importância como moeda energética fundamental para o metabolismo celular, mas esse nucleotídeo é considerado uma molécula sinalizadora tanto no meio intra quanto extracelular. Além do ATP, seus produtos de hidrólise como adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e a adenosina (ADO) também atuam como sinalizadores em diversos tecidos e órgãos (Burnstock, Arnett e Orriss, 2013).

Além das purinas (ATP, ADP e adenosina), as pirimidinas (UDP e UTP) também são importantes moléculas sinalizadoras que medeiam muitos efeitos biológicos através dos receptores purinérgicos. O ATP, ADP, UTP e UDP se ligam aos receptores P2, enquanto a ADO se liga a receptores P1. Os receptores P2 são subdivididos na família P2X e P2Y. Os receptores P2Y são metabotrópicos acoplados à proteína G, e os oito subtipos podem ser divididos em dois grupos, dependendo do tipo de proteína G acoplada: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 são acopladas à proteína Gq e ativam a proteína fosfolipase Cβ, enquanto P2Y12, P2Y13 e P2Y14 se acoplam a Gi para inibir a enzima adenilato ciclase. O receptor P2Y11 é peculiar, porque é acoplado a Gq e Gs e, assim, provoca um aumento nos níveis intracelulares de AMPc e Ca2+. Os P2X são receptores ionotrópicos ligados a canais na membrana plasmática. Há sete subtipos de receptores P2X diferentes (P2X1-7) para formar receptores triméricos. O domínio extracelular desses receptores contém sítios de ligação para ATP, antagonistas competitivos e íons metálicos moduladores. Já os domínios transmembrana formam um canal

de cátions não seletivo. As propriedades de abertura dos canais iônicos variam muito com o subtipo do receptor: com os receptores homoméricos P2X2, P2X4 e P2X7 apresentam uma dessensibilização lenta, e P2X1 e P2X3 exibem dessensibilização rápida (Di Virgilio *et al.*, 2001; Burnstock, 2007; Di Virgilio, 2012).

Os receptores P1, que têm a ADO como agonista, são divididos em quatro subtipos – A1, A2A, A2B e A3 – e são todos acoplados à proteína G. O receptor A1 medeia respostas de sinalização, que podem ser causadas por seu acoplamento a diferentes proteínas dentro da família Gi/o. A via conhecida de atuação desse receptor é através da inibição da adenilato ciclase, que causa uma diminuição no AMPc. Outro mecanismo de atuação do A1 é através da ativação da fosfolipase C (PLC), que promove o metabolismo do fosfotidilinositol de membrana, o que produz o inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG), os quais levam ao aumento do cálcio citosólico. Por sua vez, os receptores A2A são acoplados à proteína Gs, ou seja, ativam a adenilato ciclase, e o receptor A2B está acoplado a diferentes vias de sinalização, incluindo a ativação da guanilato ciclase, através do acoplamento a Gq mediado pela PLC e aumento na [Ca2+]i dependente do IP3. Já os receptores A3 estão acoplados à proteína Gi e, numa menor extensão, também à proteína Gq (Ralevic; Burnstock, 1998; Burnstock, 2013).

Compondo também o sistema purinérgico, existem as enzimas responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos e nucleosídeos, chamadas ectonucleotidases. Essas enzimas são divididas em quatro famílias de genes, que englobam ectonucleotídeopirofosfato/fosfodiesterases (ENPPs), fosfatase alcalina, ectonucleosídeotrifosfato difosfoidrolases (ENTPDases) e 5'-nucleotidase. As ENPPs atuam na hidrólise de nucleotídeos trifosfatados (ATP e UTP), em nucleotídeos monofosfatados (AMP e UMP) e pirofosfato. São encontradas sete enzimas na família das ENPPs. A ENPP1 apresenta relação com mineração óssea e calcificação tecidual e tem sido descrita por atuar na resistência à insulina de pacientes diabéticos. As fosfatases alcalinas possuem ampla especificidade de substrato para diferentes fosfatos monoésteres e outros compostos contendo fosfato, incluindo os nucleotídeos de adenina, polifosfatos inorgânicos e pirofosfato. Três isoenzimas são tecido-específicos e apresentam 90-98% de homologia, que são as fosfatases alcalinas do intestino, a placentária e aquelas das células germinativas AP. A última isoenzima, a fosfatase alcalina não tecidual (TNAP), é aproximadamente 50% idêntica às outras e é expressa principalmente nos ossos, fígado e rim (Zimmermann *et al.*, 2012; Yegutkin, 2014).

A ENTPDase comumente hidrolisa nucleotídeos di e trifosfatados em mononucleotídeos e fosfato inorgânico. Para sua máxima atividade, requer Ca2+ e Mg2+ como cofatores. Oito genes diferentes codificam membros da família da ENTPDase e diferem quanto à especificidade ao substrato, distribuição tecidual e localização celular. Quatro delas (NTPDase1, 2, 3 e 8) estão presentes na superfície extracelular das membranas. As NTPDases 5 e 6 exibem localização citoplasmática, enquanto as NTPDases 4 e 7 são inteiramente localizadas intracelularmente, de frente para o lúmen de organelas citoplasmáticas. Membros da família da NTPDase ligados à membrana são altamente glicosilados, de massas moleculares de aproximadamente 70-80 kDa e apresentam homologia de sequência em regiões especiais chamadas "regiões conservadas da apirase", as quais são importantes para a atividade catalítica da enzima. Consistem de dois domínios transmembranas próximos ao grupamento amino e carboxiterminal e ainda podem existir, quer na forma monomérica, quer na forma homo-oligomérica. Possuem seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Zimmermann *et al.*, 2012; Yegutkin, 2014).

Quanto à atividade catalítica, as diferentes isoenzimas têm afinidades diferentes pelos substratos. As NTPDase1 e 2 têm preferência por hidrolisar nucleotídeos de adenina em detrimento dos nucleotídeos de uracila, e todas as NTPDases, cujo sítio catalítico está voltado para o meio extracelular, hidrolisam mais rapidamente o ATP que o ADP. A NTPDase1 é a enzima que tem mais afinidade pelo ATP, contudo hidrolisa o produto ADP para AMP na mesma proporção. A NTPDase2 tem uma grande preferência pela hidrólise de ATP. As NTPDase3 e 8 hidrolisam ATP e UTP de forma similar. As enzimas intracelulares diferem na preferência de substrato. As NTPDase 4, 5 e 6 hidrolisam preferencialmente NTP e NDP, mas em menor proporção o ATP e o ADP. As NTPDase 5 e 6 preferem hidrolisar NTP, mas não ADP, enquanto a NTPDase7 hidrolisa preferencialmente UTP, CTP e GTP, mas tem uma afinidade muito baixa por ATP (Wang; Guidotti, 1998; Knowles; LI, 2006; Yegutkin, 2014).

A família das NTPDases também difere entre si na sua localização tecidual. A NTPDase1 está localizada principalmente nas células de resposta imune, por exemplo, linfócitos, monócitos, células endoteliais dos vasos sanguíneos e SNC. A NTPDase 2 também é expressa nos vasos sanguíneos e nas células progenitoras neuronais. Ambas as NTPDases 1 e 2 são expressas nas células acinares do pâncreas. Em subconjuntos de neurônios, em células epiteliais de tecidos incluindo

rim, vias aéreas e nos sistemas digestivo e reprodutivo, é encontrada a NTPDase 3. A NTPDase 8 tem uma expressão mais restrita, sendo encontrada no fígado, rim e intestino. Em relação à localização das isoenzimas intracelulares, elas apresentam uma expressão mais ampla, devido a seu controle de nucleotídeos no interior da célula. Seguramente, as oito isoenzimas podem ser encontradas não somente nos tecidos destacados. Por exemplo, no SNC, pode-se encontrar diferentes isoenzimas nos neurônios, astrócitos e micróglia. Essa variação ainda pode mudar de acordo com a estrutura analisada (Robson; Sevigny; Zimmermann, 2006; Zimmermann *et al.*, 2012).

A NTPDase pode ser coexpressa com outra enzima que continua com a cascata de hidrólise dos nucleotídeos, a ecto-5'-nucleotidase (CD73, E.C.3.1.3.5). A ecto-5'-nucleotidase hidrolisa ribo e desoxiribonucleotídeos 5'-monofosfatos em seus respectivos nucleosídeos. Dentre esses nucleotídeos, a função de destaque da ecto-5'-nucleotidase é a hidrólise do AMP à ADO. Essa enzima encontra-se ancorada à membrana plasmática por uma molécula de glicofosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, mas também pode ser encontrada na forma solúvel. A ecto-5'-nucleotidase de mamíferos consiste de duas subunidades glicoproteicas unidas por ligações não covalentes. O zinco e outros íons metálicos bivalentes ligam-se à extremidade do domínio N-terminal. Essa ectoenzima pertence a uma grande superfamília de metalofosfoesterases que age em diferentes substratos, tais como fosfoproteínas de Serina/Treonina, vários nucleotídeos e também esfingomielina. A ecto-5'-nucleotidase é expressa em muitos tecidos, sendo mais abundante no cólon, rim e cérebro, menos abundante em fígado, pulmão e coração. No sistema vascular, essa enzima é bastante expressa no endotélio dos vasos de grande calibre, como a aorta, e também nas plaquetas. Contudo, nas células do sistema imune, está presente em algumas subpopulações de células. Além disso, no SNC, essa enzima pode ser encontrada em diferentes estruturas, incluindo córtex cerebral, hipotálamo, hipocampo, cerebelo, bulbo olfatório, entre outros (Colgan *et al.*, 2006; Yegutkin, 2014).

IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Considerando que receptores purinérgicos estão localizados em praticamente todas as células do organismo, demonstra-se que a sinalização purinérgica está envolvida em vários mecanismos fisiológicos de sistemas como o neural, muscular, pulmonar, cardiovascular, renal, digestório, endócrino, imune, dentre outros.

O papel da sinalização purinérgica nas funções neurológicas foi o primeiro a ser descoberto e tem sido um dos mais investigados. O conceito de neurotransmissão purinérgica foi estabelecido, em 1972, por Geoffrey Burnstock. De acordo com as suas pesquisas, Burnstock demonstrou a liberação de substâncias ativas (ATP) no sistema nervoso autônomo (SNA), as quais não estavam associadas ao sistema adrenérgico ou colinérgico, evidenciando, assim, que existia outra via de sinalização envolvida, a purinérgica. Atualmente, é bem estabelecido o papel do ATP como um neurotransmissor excitatório podendo atuar também como um cotransmissor, uma vez que pode ser liberado com outros neurotransmissores, a exemplo de glutamato, noradrenalina, ácido gama-aminobutírico (GABA), acetilcolina e dopamina (Burnstock, 2006).

Os receptores tanto do tipo P1 e P2 são muito expressos em células do sistema nervoso e medeiam diversos processos relacionados, por exemplo, com neurotransmissão, neuromodulação, mielinização, aprendizado, memória e interações entre neurônios e glia (Burnstock *et al.*, 2011; Tozaki-Saitoh; Tsuda; Inoue, 2011; Puchalowiz *et al.*, 2015; Welsh; Kucenas, 2018). De um modo geral, receptores ionotrópicos P2X estão envolvidos na transmissão sináptica rápida e na plasticidade sináptica, enquanto que os receptores acoplados à proteína G, P2Y, além de regularem várias atividades pré-sinápticas, também medeiam a sinalização de longo prazo envolvidas, por exemplo, com proliferação, diferenciação e morte celular (Tozaki-Saitoh; Tsuda; Inoue, 2011). Uma das funções mais conhecidas dos receptores P1 no sistema nervoso central (SNC) é o seu papel na neuromodulação, uma vez que a adenosina, ao interagir com esses receptores, é capaz de controlar a ação de vários neurotransmissores (Sebastião; Ribeiro, 2009).

Nas junções neuromusculares, há a interligação entre a sinalização purinérgica nervosa e muscular. Diversos receptores purinérgicos, como P2X1, P2X4,

P2X5, P2Y1, P2Y2, P2Y3, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y13 e P2Y14, estão presentes nas fibras musculares e podem desempenhar distintas funções por meio de sinais mediados por ATP e ADP. Em humanos, já foram verificadas a presença dos receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 e P2X1 na célula muscular diferenciada. Os nucleotídeos extracelulares podem ser liberados de diferentes células em torno do músculo, como neurônio motor, células endoteliais e ósseas, que podem atuar diretamente em células musculares (Burnstock; Arnett; Orriss, 2013). Jiménez *et al.* (2018) mostraram que o ATP extracelular promove o aumento da síntese proteica no músculo esquelético de roedores por meio da ativação de receptores P2Ys e da via de sinalização Akt-mTOR. Assim, apesar de haver diferenças na expressão dos receptores entre espécies, as vias de sinalizações intracelulares que explicam as adaptações musculares no exercício ou mesmo em outras condições, como hipertrofia, captação de glicose, contração e liberação de miocinas, podem ser induzidas pelos receptores purinérgicos e proporcionarem implicações significativas para a saúde (Burnstock; Arnett; Orriss, 2013).

Em relação ao sistema respiratório, já tem sido documentado que componentes do sistema purinérgico estão presentes nas vias aéreas superiores e inferiores e nos pulmões, ajudando a controlar esse sistema de diversas formas. Por exemplo, as células epiteliais alveolares do tipo I (ATI) liberam ATP quatro vezes mais em resposta ao estiramento/estresse do que as células ATII; concluiu-se que as células ATI são mecanossensores no pulmão e que a estimulação parácrina das células ATI pelo ATP liberado por essas células desempenha um papel na regulação da secreção de surfactante. Ainda, o ATP liberado mecanicamente das células epiteliais das vias aéreas tem ação cílios estimulatórias na mucosa respiratória de animais e humanos. Esse mecanismo auxilia, via receptores P2X, na depuração mucociliar, a qual serve como mecanismo primário de defesa do hospedeiro para remover poeira e microorganismos dos pulmões (Burnstock *et al.*, 2012).

Ainda no sistema respiratório, a liberação de mucina das células caliciformes das vias aéreas é estimulada pelo ATP, atuando através de receptores P2. Os receptores P2U (isto é, P2Y2 e/ou P2Y4) foram posteriormente implicados na regulação da secreção de mucina pelo ATP e pelo UTP em linhagem de células caliciformes das vias aéreas e em células brônquicas humanas diferenciadas. Posteriormente, comprovou-se que o ATP causa liberação de mucina das células caliciformes em ratos e em humanos. O UTP pode melhorar a secreção de mucina e a expressão do gene da mucina através de diferentes vias de sinalização em

culturas de tecidos traqueobrônquicos humanos. Os receptores P2Y2 fornecem uma via principal para a regulação da secreção de mucina por ATP e UTP que atuam nas membranas apicais das células caliciformes via fosfolipase C (Burnstock *et al.*, 2012). Verifica-se, por meio dos exemplos citados, que a sinalização purinérgica está envolvida em diversas funções celulares no trato respiratório.

Sobre a sinalização purinérgica no sistema cardiovascular, hoje se estabelece que os nucleotídeos e nucleosídeos atuam nos purinoreceptores dos cardiomiócitos, nós atrioventricular e sinoatrial, fibroblastos cardíacos e vasos sanguíneos coronários. O tônus vascular é controlado por um mecanismo duplo. O ATP, liberado dos nervos simpáticos perivasculares, causa vasoconstrição em grande parte via receptores P2X1. As células endoteliais liberam ATP em resposta a alterações no fluxo sanguíneo (por estresse de cisalhamento) ou hipóxia, para atuar nos receptores P2 nas células endoteliais para produzir óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio ou prostaglandinas, causando vasodilatação. O ATP também é liberado dos nervos sensório-motores durante a atividade do reflexo antidrômico, para produzir relaxamento de alguns vasos sanguíneos. A sinalização purinérgica está envolvida na fisiologia dos eritrócitos e plaquetas. O ATP é liberado pelos eritrócitos e plaquetas, e os purinoreceptores e ectonucleotidases são expressos por essas células. Os receptores P1, P2Y1, P2Y12 e P2X1 são expressos em plaquetas, que mediam a agregação plaquetária e a mudança de forma. As ações (tróficas) de longo prazo dos nucleosídeos e nucleotídeos de purina e pirimidina promovem a migração e a proliferação do músculo liso vascular e das células endoteliais via receptores P1 e P2Y, podendo ter implicações patológicas, dependendo da intensidade (Burnstock, 2017).

Existem evidências de que o ATP também aumenta a atividade mecânica e a produção de inositol trifosfato no coração, indicando mediação pelos receptores P2Y. Os efeitos inotrópicos positivos do ATP nos cardiomiócitos parecem ser mediados pelos receptores P2Y11. Existem interações entre receptores purinérgicos e adrenérgicos na regulação da contratilidade miocárdica no desenvolvimento pós-natal. A ativação do ATP via adenosina e receptor P1 aumenta a secreção de peptídeo natriurético atrial, enquanto a UTP via receptores P2Y diminui a secreção de peptídeo natriurético atrial. A sinalização mediada pelo receptor P2Y está envolvida na sincronização intercelular de oscilações intracelulares de Ca2+ em miócitos cardíacos. O estresse de cisalhamento induz uma onda Ca2+ através da liberação autócrina de ATP que atua nos receptores P2Y1

nos miócitos atriais. Os efeitos da nicotinamida adenina dinucleotídeo no coração parecem ser mediados por receptores P2. Cabe ressaltar que a sinalização purinérgica parece estar envolvida no desenvolvimento embrionário do coração, uma vez que a ativação por ATP e ADP é capaz de promover a cardiomiogênese de células-tronco embrionárias (Burnstock, 2017).

O ATP extracelular também tem se destacado por ter uma função na regulação do tônus vascular dos rins e, consequentemente, da fisiologia renal. O ATP extracelular pode modular a microcirculação renal através da ligação aos receptores P2X (vasoconstrição) e P2Y (vasodilação). A sinalização purinérgica também está envolvida em vários outros mecanismos renais importantes, tais como feedback tuboglomerular, controle da liberação de renina, uma enzima que regula a entrada e saída de sangue do glomérulo com aumento ou diminuição da pressão arterial, e o transporte de água e eletrólitos no túbulo renal (Chan; Unwin; Burnstock, 1998; Vallon; Muhlbauer; Osswald, 2006; Burnstock; Vaughn; Robson, 2014). Além disso, cabe destacar também que tanto o ATP liberado de neurônios parassimpáticos como o urotélio estão envolvidos no processo de contração da bexiga. O urotélio expressa vários tipos de receptores purinérgicos e durante o processo de enchimento da bexiga tem sido sugerido que o ATP ao interagir com receptores P2X3 e P2X2 em nervos sensoriais suburoteliais, pode mediar uma via de sinalização importante relacionada ao início do reflexo miccional e a sensação de enchimento e urgência da bexiga (Burnstock, 2014; Andersson, 2015).

Em órgãos do sistema gastrointestinal, várias ações fisiológicas têm sido mediadas pela sinalização purinérgica. Tanto o ATP quanto a adenosina têm sido implicados em regular a motilidade do trato gastrointestinal (Bornstein, 2008). No intestino, o ATP também atua na regulação da secreção e absorção de células epiteliais e no controle do tônus vascular intestinal. Em estudos experimentais com ratos, tem sido demonstrado que os receptores A1 e em menor extensão os A2A e A2B contribuem para a vasodilatação mediada por adenosina no jejuno. Purinoreceptores P2X e P2Y também estão envolvidos em processos como liberação de bile, metabolismo de glicogênio, secreção gástrica e das glândulas salivares e a neurotransmissão entérica (Burnstock, 2014).

Receptores purinérgicos (P2 e P1) e ectonucleotidases também são expressos nas células pancreáticas e influenciam a atividade das células alfa e beta, produtoras de glucagon e insulina, respectivamente. Os receptores P2 podem aumentar e amplificar os sinais associados ao efeito da glicose na secreção de insulina ou

apoptose das células beta. Os receptores P2X facilitam o influxo de Ca2+/Na+ e a despolarização da membrana e, como resultado, podem provocar secreção de insulina mesmo em baixas concentrações de glicose. Alguns receptores P2Y aumentam o Ca2+ celular e ativam as vias da proteína quinase C (PKC). Além disso, outros receptores P2Y e adenosina afetam a via do cAMP e possivelmente a sinalização Epac. Nas células alfa pancreáticas, foi demonstrado que o ATP estimula a secreção de glucagon. Outros estudos demonstraram que o feito do ADP seria ainda maior que o do ATP nesse estímulo. Também há evidência da participação de receptores de adenosina A2 em células alfa secretoras de glucagon (Burnstock; Novak, 2012; Bjelobaba; Janjic; Stojilkovic, 2015).

A glândula tireoide é inervada por aferentes simpáticos, parassimpáticos e sensoriais e, portanto, o ATP pode ser coliberado das terminações nervosas, das células endoteliais capilares ou das próprias células da tireoide. Muito pouco se sabe sobre as E-NTPDases na fisiologia da glândula tireóide. A atividade da eN foi detectada na glândula tireóide normal, enquanto as células do carcinoma papilífero da tireoide expressam fortemente a mesma enzima. A análise imuno-histoquímica da glândula tireóide sugeriu a expressão de P2X3R, P2X4R e P2X5R em células foliculares e endoteliais, mas não em células parafoliculares. Os tireócitos humanos expressam os mRNAs P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7. Os tireócitos humanos também expressam os mRNAs dos receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4 e P2Y11 e o ATP induz a produção e liberação de interleucina-6 dessas células, presumivelmente através da ativação de um desses receptores. Em estados patológicos, mas não em estados fisiológicos, há também a expressão de receptores de adenosina nas células da tireoide (Bjelobaba; Janjic; Stojilkovic, 2015).

As células imunes possuem receptores purinérgicos e ectonucleotidases; possuem, portanto, muitas de suas funções controladas pela sinalização purinérgica. O ATP atualmente é reconhecido como um DAMP (padrão molecular associado ao dano), sendo liberado no meio extracelular em resposta a algum dano celular. A estimulação de neutrófilos e células T leva à liberação rápida de ATP, que aciona ciclos de feedback purinérgicos autócrinos que amplificam os estímulos fracos que essas células recebem durante a ativação celular (Ferrari *et al.*, 2016). Não apenas o ATP, mas vários mecanismos de sinalização purinérgicos regulam a ativação dos diferentes tipos de células do sistema imunológico. Por exemplo, a ativação de células T induz a liberação de ATP através dos canais da panexina 1 que se translocam com os receptores P2X para a sinapse imune com

outras células imunes, onde promovem o influxo de cálcio e a ativação celular por meio de sinalização purinérgica autócrina. Os neutrófilos liberam ATP em resposta aos mediadores quimiotáticos, e a sinalização autócrina, através de receptores purinérgicos, regula a quimiotaxia dessas células. A ativação de receptores purinérgicos nas células imunes pode desencadear mecanismos de feedback positivo ou negativo e, portanto, pode regular rigidamente as respostas imunes (Junger, 2011; Eltzschig; Sitkovsky; Robson, 2012).

Além dos mecanismos de retroalimentação autócrina que regulam a função das células imunes saudáveis, os receptores purinérgicos permitem que as células imunes reconheçam o ATP extracelular. Assim, os sistemas de sinalização purinérgica das células imunes atuam no reconhecimento dos sinais de "perigo", e o ATP, liberado pelas células estressadas, atua como um "sinal de busca" que guia os fagócitos para os locais inflamados e promove a eliminação de células apoptóticas e danificadas. A sinalização purinérgica também é crucial para a ativação de inflamassomas (responsáveis pela ativação de processos inflamatórios) e a subsequente liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1β (IL-1β), em resposta a DAMPs. Já a adenosina extracelular atua como um sinal imunorregulatório que modula a função de vários componentes celulares da resposta imune adaptativa e inata. Dada sua atividade principalmente imunossupressora, sabe-se que a adenosina interfere em estágios posteriores do processo inflamatório como mediador de feedback negativo, ativando células T Regulatórias e mediando a liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, por exemplo (Antonioli *et al.*, 2012; Ferrari *et al.*, 2016). Sendo assim, verifica-se que o equilíbrio entre as concentrações de ATP (pró-inflamatório) e adenosina (anti-inflamatória) é um fator crucial na homeostase imune e, dessa forma, as ectonucleotidases possuem um papel importante na regulação dos níveis desses nucleotídeos e nucleosídeo.

A partir do exposto, conclui-se que o sistema purinérgico participa ativamente dos mecanismos celulares fisiológicos em praticamente todos os tecidos e órgãos, sendo parte importante do funcionamento do organismo como um todo. Muito se negligencia sobre esse sistema, possivelmente por falta de divulgação dos estudos dessa área. Este livro foi lançado com o intuito de disseminar o conhecimento já existente sobre as implicações fisiopatológicas da sinalização purinérgica em diversas situações, como se verifica nos próximos capítulos.

REFERÊNCIAS

ANDERSSON, K. Purinergic signaling in the urinary bladder. Autonomic Neuroscience, v. 191, p. 78-81, 2015.

ANTONIOLI, L.; COLUCCI, R.; LA MOTTA, C.; TUCCORI, M.; AWWAD, O.; DA SETTIMO, F.; BLANDIZZI, C.; FORNAI, M. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. Current Drug Targets, v. 13, p. 842-862, 2012.

BJELOBABA, I.; JANJIC, M. M.; STOJILKOVIC, S. S. Purinergic signaling pathways in endocrine system.Autonomic Neuroscience, v. 191, p. 102-116, 2015.

BORNSTEIN, J. Purinergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility. Purinergic Signalling, v. 4, p. 197-212, 2008.

BURNSTOCK, G.; ARNETT, T. R.; ORRISS, I. R. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. Purinergic signalling, v. 9, n. 4, p. 541-72, dez. 2013.

BURNSTOCK, G.; BROUNS, I.; ADRIAENSEN, D.; TIMMERMANS, J. P. Purinergic signaling in the airways. Pharmacological Reviews, v. 64, n. 4, p. 834-68, 2012.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. Trends in Pharmacological Sciences, v. 27, n. 3, p. 166-176, 2006.

BURNSTOCK, G.; KRUGEL, U; ABRACHIO, M.; ILES, P. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. Progress in Neurobiology, v. 95, p. 229-274, 2011.

BURNSTOCK, G. Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. Physiological Reviews, v. 87n. 2, p. 659-797, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. Pharmacological Reviews, v. 24, p. 509-581, 1972.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. Circulation Research, v. 120, p. 207-228, 2017.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in the gastrointestinal tract and related organs in health and disease. Purinergic Signalling, v. 10, p. 3-50, 2014.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Pathophysiology and therapeutic potential. The Keio Journal of Medicine, v. 62, n. 3, p. 63-73, 2013.

BURNSTOCK, G.; NOVAK, I. Purinergic signalling in the pancreas in health and disease. Journal of Endocrinology, v. 213, n. 2, p. 123-141, 2012.

BURNSTOCK, G.; VAUGHN, B; ROBSON, S. Purinergic Signalling in the Liver in Health and Disease. Purinergic Signalling, v. 10, p. 51-70, 2014.

CHAN, C.; UNWIN, R.; BURNSTOCK, G. Potential functional roles of extracellular ATP in kidney and urinary tract. Experimental Nephroloy, v. 6, p. 200-2007, 1998.

COLGAN, S. P.; ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T.; THOMPSON, L. F. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). Purinergic Signalling, v. 2, n. 2, p. 351-360, 2006.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D. *et al.* Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory

molecules in blood cells. Blood, v. 97, n. 3, p. 587-600, 2001.

DI VIRGILIO, F. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. Cancer Research, v. 72, n. 21, p. 5441-5447, 2012.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V., ROBSON, S. C. Purinergic signaling during inflammation. New England Journal of Medicine, v. 367, p. 2322-2333, 2012.

FERRARI, D.; MCNAMEE, E. N.; IDZKO, M.; GAMBARI, R.; ELTZSCHIG, H. K. Purinergic Signaling During Immune Cell Trafficking. Trends Immunology, v. 37, p. 399-411, 2016.

JIMÉNEZ, C. M. *et al.* Extracellular ATP promotes protein synthesis in skeletal muscle through activation of the Akt-mTOR signaling pathway. The FASEB Journal, v. 32, n. 1_supplement, p. 856.29, 2018.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. Nature Reviews Immunology, v. 11, p. 201-212, 2011.

KNOWLES, A. F.; LI, C. Molecular cloning and characterization of expressed human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 (E-NTPDase 8) and its soluble extracellular domain. Biochemistry, v. 45, n. 23, p. 7323-7333, 2006.

PUCHALOWICZ, K.; BARANOWSKA-BOSIACKA, DZIEDZIEJKO, V., CHLUBEK, D. Purinergic signalling and the functioning of the nervous system cells. Cellular & Molecular Biology Letters, v. 20, p. 867-918, 2015.

RALEVIC, V., BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacological Reviews, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signalling, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine receptors and the central nervous system. Handbook of Experimental Pharmacology, v. 193, p. 471-534, 2009.

TOZAKI-SAITOH, H.; TSUDA, M.; INOUE, K. Role of purinergic receptors in CNS function and neuroprotection. Advances in Pharmacology, v. 61, p. 495-528, 2011.

VALLON, V.; MUHLBAUER, B.; OSSWALD, H. Adenosine and Kidney function. Physiological Reviews, v. 86, p. 901-904, 2006.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. Journal of Biological Chemistry, v. 273, n. 18, p. 11392-11399, 1998.

WELSH, T; KUCENAS, S. Purinergic signaling in oligodendrocyte development and function. Journal of Neurochemistry, v. 145, p. 6-8, 2018.

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, v. 49, n. 6, p. 473-497, 2014.

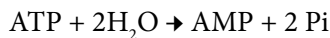
ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. Purinergic Signalling, v. 8, n. 3, p. 437-502, 2012.

O SISTEMA PURINÉRGICO E A HISTÓRIA DAS PURINAS

Ana Maria Battastini
Maria Rosa Chitolina Schetinger

ECTO-NUCLEOTIDASES

Enzimas que catalisam a hidrólise dos grupos fosfatos do ATP, originalmente denominadas "apirases" ou ATP difosfoidrolases (EC 3.6.1.5) são enzimas que catalisam a hidrólise de nucleosídeos tri- e difosfato (ATP, ADP) na presença de cátions divalentes (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}), aos seus respectivos monofosfonucleotídeos (AMP), com liberação de fosfatos inorgânicos como esquematizado na sequência.

$$ATP + 2H_2O \rightarrow AMP + 2\ Pi$$

Essas enzimas se diferenciam das ATPases intracelulares, por terem ampla especificidade pelos substratos, podendo hidrolisar nucleosídeos tri- e difosfato além do ATP, estando em geral associadas à membrana com sítio ativo voltado para o meio extracelular ou para o lúmen das organelas. Além disso, algumas formas solúveis dessas enzimas também são identificadas.

Historicamente, os primeiros estudos sobre "apirases" coincidem com as investigações sobre os processos de fermentação em células de leveduras e plantas, que levam à descrição de importantes vias metabólicas tais como a "via glicolítica". A hidrólise enzimática do ATP com a liberação de 2 fosfatos foi demonstrada pela

primeira vez em músculo esquelético por Lohmann (1928), no início do século passado. Em 1943, Colowick & Kalckar demonstraram que essa atividade era devida à ação combinada de uma ATPase e uma "mioquinase". No ano seguinte, Kalckar (1944) descreveu a atividade adenilpirofosfatásica em extratos de fígado e batata. Entretanto, foi Meyerhof (1945) o primeiro pesquisador a propor o nome "apirase" para descrever uma AdenilPirofosfatase, quando investigava o processo de fermentação da glicose por células de levedura. Esse autor já relata, em seus estudos, uma preocupação com o que parece ser uma caraterística das "apirases" de diferentes origens, ou seja, a relativa sensibilidade aos processos de extração e purificação. Essa caraterística parece ter dificultado durante anos a investigação das características cinéticas de tais enzimas. Posteriormente, em 1957, essa atividade enzimática foi nomeada também como uma "Ecto-ATPase" por Engelhardt, demonstrando, assim, que, historicamente, houve uma dificuldade em identificar as enzimas que hidrolisavam os dois fosfatos do ATP e que eram diferentes das ATPases intracelulares.

Em tecidos de vertebrados, uma ATP difosfoidrolase (EC 3.6.1.5) havia sido identificada como associada à membrana plasmática de vários tecidos e células animais, tais como eritrócitos humanos (Herbert, 1956), plasma sanguíneo humano (Holmsen; Holmsen, 1971), pâncreas de porco (LeBel *et al.*, 1980; Lalibertè; Beaudoin, 1983), membrana plasmática de células normas e tumorais (Knowles *et al.*, 1983), glândulas salivar e mamária de ratas (Valenzuela *et al.*, 1989).

O Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) é responsável pela manutenção da lista de enzimas publicada pela primeira vez em 1961, com a última edição impressa em 1992 (IUBMB, 1992). Desde 1992, a lista foi atualizada eletronicamente pelo uso da web. Paralelamente a esse processo, todas as recomendações publicadas pelo Comitê também foram convertidas para um formato legível pela *web*. Por esse Sistema de Classificação, o número EC 5.6.1.5 identifica a atividade enzimática com as seguintes características:

Accepted Name
Apyrase
Alternative Name (s)
Adenosine diphosphatase ADPase ATP-diphosphatase ATP-diphosphohydrolase
Reaction catalysed
A nucleoside 5'-triphosphate + 2 H(2)O <=> a nucleoside 5'-phosphate + 2 phosphate
Cofactor(s)
Ca(2+).
Comment(s)
• Apyrases are active against both di- and triphosphate nucleotides (NDPs and NTPs) and hydrolyze NTPs to nucleotide monophosphates (NMPs) in two distinct successive phosphate--releasing steps, with NDPs as intermediates. • They differ from ATPases, which specifically hydrolyze ATP, by hydrolyzing both ATP and ADP. • Most of the ecto-ATPases that occur on the cell surface and hydrolyze extracellular nucleotides belong to this enzyme family.

Atualmente, é possível acessar as características enzimáticas pelo sistema BRENDA, um banco de dados abrangente sobre informações funcionais e moleculares de enzimas, com base na literatura. A base de dados contém informações extraídas e avaliadas a partir de aproximadamente 46.000 referências, com dados de, pelo menos, 40.000 enzimas diferentes de mais de 6.900 organismos distintos, classificados em aproximadamente 3.900 números E.C. (Schomburg *et al.*, 2004).

ESTUDOS PIONEIROS NO BRASIL

No Brasil, a história dos estudos sobre as "apirases" começou com os trabalhos pioneiros sobre a caracterização e purificação dessas enzimas em saliva de insetos hematófagos, os quais foram publicados pelo Dr. José Marcos Ribeiro e seus colaboradores (Ribeiro; Garcia, 1980; Ribeiro *et al.*, 1984, 1989, 1990). Em 1985, o Prof. João José Freitas Sarkis caracterizou e purificou uma apirase em

saliva de *Rhodnius prolixus*, como resultado de sua tese, realizada sob a supervisão do Prof. José Marcos Ribeiro e do Prof. Jorge Gumarães (*Apirase salivar do Rhodnius prolixus: cinética e purificação*. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Ciências, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 1985). Os resultados dessa tese fundamentaram o desenvolvimento de uma nova e produtiva linha de pesquisa coordenada pelo Prof. Sarkis quando do seu retorno ao Departamento de Bioquímica da UFRGS em Porto Alegre (Ribeiro *et al.*, 1986; Sarkis *et al.*, 1984).

Em 1986, quando o Prof. Sarkis estava retornando ao Departamento de Bioquímica da UFRGS, foram publicados dois trabalhos que caracterizavam "ectonucleotidases" em sinaptossomas colinérgicos do órgão elétrico de *Torpedo marmorata* (Grondal; Zimmermann, 1986) e em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos (Nagy *et al.*, 1986). A autora Agnes Nagy havia publicado, em 1983, um trabalho tratando da caracterização de uma "adenosina trifosfatase" na superfície externa de sinaptossomas de cérebro de galinha (Nagy *et al.*, 1983). Se acompanharmos a literatura desses dois autores, Dr. Zimmermann e Dr. Nagy, observamos que eles muito contribuíram, na década de 1980, para os estudos sobre as enzimas que hidrolisam o ATP no sistema nervoso periférico e central. As enzimas que hidrolisavam o ATP extracelular eram identificadas na literatura como ecto-ATPases, uma vez que elas apresentavam características que as distinguiam das ATPases intracelulares já bastante bem caracterizadas (Na^+, K^+-ATPAses, H^+-ATPases e Ca^{2+}-ATPases), sendo a principal diferença o fato de terem seu sítio ativo voltado para o espaço extracelular, de onde se origina a denominação "ecto". Importante também comentar que o Dr. Herbert Zimmermann foi pioneiro na descrição não somente das "ecto-ATPases", como também da ecto-5´-nucleotidase que hidrolisa o AMP, gerando adenosina (Zimmermann, 1992; Zimmermann *et al.*, 1993).

Chamou a atenção do Prof. Sarkis o fato de que, em muitos trabalhos encontrados na literatura, havia uma aparente confusão quanto à nomenclatura e à identificação das características cinéticas das enzimas então denominadas "ecto-ATPases". A partir dessa ideia, o Prof. Sarkis, ao começar a sua linha de pesquisa, passou a investigar essas enzimas em membranas de cérebro de ratos. Como resultado de sua primeira orientação, foi publicado um artigo no qual se caracterizou uma apirase em sinaptossomas de hipotálamo de ratos (Schadeck et al, 1989). Em sua segunda orientação, o Prof Sarkis partiu para a purificação

dessa enzima a fim de obtê-la de forma homogênea e, assim, poder melhor caracterizá-la, como fizera no seu doutorado com a enzima de saliva de *Rhodnius prolixus*. Infelizmente, a purificação da enzima de hipotálamo não foi bem-sucedida (Dissertação de Mestrado Helena Cimarosti, 1987). Mais tarde, em 1996, se descobriu a razão dessa dificuldade. Nesse ano, o Prof. Sarkis saiu para um estágio de Pós-Doutorado em Barcelona, na Espanha, onde continuou sua busca pela real identidade molecular da enzima que hidrolisava o ATP extracelular por membranas sinápticas. No seu pós-doc, o Prof. Sarkis caracterizou como uma "ATP difosfoidrolase" a enzima anteriormente caracterizada por Zimmermann como uma "ecto-ATPase" em membranas sinaptossomais do órgão elétrico de *Torpedo marmorata* (Sakis; Saltó, 1991). De fato, os estudos posteriores mostraram que não existem apenas duas enzimas capazes de hidrolisar o ATP até AMP, mas oito enzimas com localização, características e identidades moleculares distintas (Simon *et al.*, 2006; Zimmermann, 2012). Retornando do seu pós-doc, o Prof Sarkis orientou mais dois alunos – o Prof. João Batista Teixeira da Rocha e a Profa. Ana Maria Oliveira Battastini –, os quais seguiram os estudos sobre as "ecto-apirases" em sistema nervoso central (SNC). O Prof. João Batista Rocha estudou os efeitos da desnutrição materna sobre as atividades ATPásica e ADPásica em sinaptossomas de cérebro de ratos, bem como o efeito de fármacos sobre essas atividades (Rocha *et al.*, 1990a, 1990b). No seu mestrado, a Profa. Ana Battastini caracterizou essa enzima em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos (Battastini *et al.*, 1991). Nesse estudo, ocorreu uma nova preparação de sinaptossomas, utilizando-se gradiente de Percoll, introduzindo-se, assim, uma nova técnica no laboratório, a qual foi utilizada por vários outros alunos, gerando muitos artigos presentes na produção científica do Prof. Sarkis. Na sequência ao seu mestrado, a Profa. Ana Battastini realizou o doutorado sob a orientação do Prof. Renato Dutra Dias do mesmo laboratório. Nessa ocasião, ela se propôs novamente a purificar a enzima a partir de membrana plasmática sináptica de cérebro de ratos. Mais uma vez, foi encontrada uma grande dificuldade em atingir a purificação dessa enzima. Nessa pesquisa, foi mostrado que a enzima responsável pela hidrólise do ATP até AMP era extremamente sensível a praticamente todos os detergentes normalmente utilizados para extrair a enzima da membrana (Battastini *et al.*, 1995; 1998).

PROTOCOLOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE UMA APIRASE/ATP DIFOSFOIDROLASE

Até 1995, devido à falta de informações sobre a identidade molecular das apirases e, consequentemente, à falta das informações sobre as enzimas da grande família das NTPDases, o que só se estabeleceu entre 1996 e início dos anos 2000, a caracterização de uma apirase/ATP difosfoidrolase que permitia distingui-la de uma ATPase se baseava essencialmente na exclusão de combinações enzimáticas que pudessem mimetizar tais atividades. Para tanto, alguns protocolos estavam bem estabelecidos e incluíam a exclusão da presença de enzimas "contaminantes – Quadro 1 (Battastini *et al.*, 1991). Embora esses ensaios fossem bastante simples, muitos trabalhos na literatura se baseavam nesses protocolos para caracterizar uma ATP-difosfoidrolase e, durante muitos anos, foram descritos na literatura.

Quadro 1 – Protocolos para caracterização de uma apirase/ATPdifosfoidrolase

Associação enzimática	Excluída por
Adenilato cinase + ATPase	Ensaio enzimático dessa enzima quando se oferecia ADP como substrato
ATP pirofosforilase + pirofosfatase inorgânica	Incubação do substrato pirofosfato inorgânico
Fosfatases inespecíficas	Incubação com ésteres de fosfato (glcose-6--fosfato e β-glicerofosfato
ATPase + ADPase	Ensaio com ATP + ADP – "mixed substrate assay" Se atividade for uma média das atividades separadamente, indica que temos uma enzima agindo sobre os dois substratos.
ATPases intracelulares	Uso de inibidores específicos (ouabaína, oligomicina, ortovanadato, FITC, entre outros)

DÉCADA DE 1990 – UM MARCO HISTÓRICO PARA OS ESTUDOS SOBRE ECTO-APIRASES/ECTO-ATPASES

Em 1995, a primeira revisão completa e extensiva sobre a "ubíqua ecto-ATPase" foi publicada (Plesner, 1995). Essa revisão foi um marco histórico no campo das ecto-enzimas que hidrolisam o ATP. Nesse mesmo ano, a Dra. Plesner, em associação com dois outros importantes pesquisadores da área das nucleotidases, Dr. A. Knowles e Dr. T. Kirley, organizou o "First Workshop on Ecto-ATPases", que ocorreu em agosto de 1996, em Mar del Plata, na Argentina. Nesse encontro, que foi fundamental para o desenvolvimento e futuras colaborações entre os diferentes laboratórios do mundo, reuniram-se praticamente todos os cientistas que trabalhavam com as enzimas denominadas de ecto-ATPases, apirases ou ecto-ATP difosfoidrolases. Ao final de uma semana intensa de apresentação de trabalhos, o grupo de pesquisadores reuniu-se e propôs que uma comissão internacional se encarregasse de organizar a nomenclatura das "apirases" (Zimmermann *et al.*, 2000).

O ano de 1996 foi fundamental para os estudos sobre as ecto-ATPases/ecto-apirases/ecto-ATPdifosfoidrolases, não somente por esse encontro científico, mas porque foi publicado o primeiro estudo em que a enzima apirase de batata foi clonada e sua estrutura primária sequenciada (Handa; Guidotti, 1996). Nesse mesmo ano, Wang e Guidotti mostraram que a proteína CD39 (lymphoid cell activation antigen, CD39) que havia sido clonada previamente era a mesma proteína apirase (Wang; Guidotti, 1996; Wang *et al.*, 1997). Nesse estudo, foram identificadas as "5 regiões conservadas da apirase", denominadas ACRs. Nos anos seguintes, o autor publicou alguns trabalhos fundamentais sobre o gene que a codifica e a estrutura quaternária da proteína, a identificação de seu "ancoramento" por dois domínios transmembrana e a sensibilidade aos detergentes. Isso explicou a dificuldade na extração e purificação observada por vários autores. No final dos anos 90 e início dos anos 2000, realizou-se intensa pesquisa sobre a estrutura das "apirases/ecto-ATPAses", tais como identidade molecular, formação de oligômeros, sítios de glicosilação, formas solúveis, relações filogenéticas, principais ligantes, estrutura cristalina, estrutura do sítio ativo e mecanismo de catálise. Em 1999 e em 2002, foram realizados o segundo e o terceiro *workshop* sobre ecto-ATPAses, na Bélgica

e nos Estados Unidos, respectivamente. No segundo encontro, uma comissão de pesquisadores apresentou uma proposta de nomenclatura para essas enzimas e, a partir disso, as ecto-ATPases/apirases ou ATP difosfoidrolases passaram a ser nomeadas como ecto-nucleosideotrifosfodifosfoidrolases e representadas simplificadamente como NTPDases. A partir desse encontro realizado em 1999, na Bélgica, o interesse pelas enzimas que hidrolisam o ATP até adenosina foi ampliado com a inclusão de trabalhos sobre as ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases e a ecto-5´-nucleotidase. Ficou muito clara, desde então, a complexidade da cadeia de enzimas que participam do controle dos nucleotídeos/nucleosídeos no espaço extracelular. Hoje está muito bem estabelecido que a hidrólise do ATP extracelular à adenosina é catalisada por várias famílias de ectoenzimas, nas quais são identificadas as ecto-NTPDases (1-8), as ecto-fosfodiesterases/pirofosfatases (1-3), a ecto-5'-nucleotidase/CD73 e também as ecto-fosfatases alcalinas. Várias excelentes revisões têm discutido a participação das múltiplas ecto-nucleotidases na hidrólise de ATP e outros nucleotídeos no meio extracelular, as quais são recomendadas para leitura a fim de uma revisão sobre o assunto (Knowles, 2011; Zimmermann *et al.*, 2012).

Estudos recentes demonstraram uma via alternativa para o metabolismo extracelular de nucleotídeos e consequente formação de adenosina, iniciada por ação de uma NADase/CD38 que hidrolisa o NAD^+, gerando adenosina difosfato-ribose (ADPR) ou adenosina difosfato cíclica ribose (cADPR), que são hidrolisados pela ecto-pirofosfatase/fosfodiesterases 1 (NPP1/CD203a), e promovendo a formação de AMP, o qual finalmente é metabolizado pela ecto-5'-nucleotidase/CD73 em adenosina. Essa rota, embora não envolva a hidrólise do ATP, se constitui numa rota "alternativa" de geração de adenosina em alguns sistemas biológicos, especialmente no sistema imune e nas células do câncer (Horenstein *et al.*, 2013).

PRINCIPAIS TRABALHOS ORIENTADOS PELO PROF. SARKIS ENVOLVENDO A ATIVIDADE DA ENZIMA ATP-DIFOSFOIDROLASES/APIRASES

Na Tabela 1, apresenta-se a sequência dos principais trabalhos do grupo liderado pelo Prof. Sarkis envolvendo a atividade da enzima ATP-difosfoidrolase.

Os trabalhos foram separados por tópicos que representam esse importante legado científico e foram assim designados: efeito de metais sobre a hidrólise do ATP e ADP; estudos em diferentes doenças; caracterização e estudo em diferentes linhagens celulares; estudos em modelos de câncer; efeitos de diferentes compostos sobre a hidrólise do ATP e ADP. É importante salientar que os trabalhos de caracterização e separação de sinaptossomas (Battastini *et al.*, 1991) e de separação de plaquetas (Frasetto *et al.*, 1993 e Pilla *et al.*, 1996) deram origem a várias publicações que se seguiram e são utilizados até hoje em diferentes laboratórios que trabalham com a enzima.

Neste histórico apresentado, podemos acompanhar os projetos que foram desenvolvidos ao longo dos anos. Por exemplo, a hidrólise de ATP e de ADP é dependente de metais divalentes tais como o cálcio e o magnésio. Nesse contexto, como demonstrado, o Prof. Sarkis teve interesse em estudar metais com características tóxicas sobre a atividade da enzima. Assim, a Profa. Maria Rosa Chitolina estudou o efeito do alumínio (Schetinger *et al.*, 1995), e a Profa. Claudia Barcellos estudou o efeito do cádmio (Barcellos *et al.*, 1994) em sinaptossomas de cérebro de ratos. Já a Profa. Edilamar Oliveira estudou o efeito do mercúrio em músculo cardíaco (Oliveira *et al.*, 1994).

Outro aspecto de interesse foram algumas doenças estudadas pelo grupo de pesquisa. Os trabalhos da Profa. Angela Wyse estudaram os efeitos da fenilalanina e seus metabólitos sobre a hidrólise do ATP e ADP (Wyse *et al.*, 1994; 1995), e os trabalhos da Profa. Carla Bonan estudaram o efeito de diferentes fármacos sobre a atividade da enzima bem como processos de aprendizagem e memória e epilepsia (Bonan *et al.*, 1997; 1998; 1999; 2000). O câncer também foi objeto de estudo do grupo de pesquisa. Em trabalhos utilizando as células de tumor de Walker 256, observou-se a importante participação da degradação do ATP e ADP e, portanto, da via purinérgica no câncer (Buffon *et al.*, 2006, 2007a, 2007b), assim como os estudos com células de glioma, em colaboração com a Profa. Ana Battastini (Wink *et al.*, 2003a; 2003b).

Tabela 1: Principais trabalhos publicados pelo grupo do Professor Sarkis

ANO	TÍTULO DA PUBLICAÇÃO	AUTORIA	DESCRIÇÃO
EFEITO DE METAIS SOBRE A HIDRÓLISE DO ATP E ADP			
1994	In vitro and in vivo effects of HgCl2 on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from cerebral cortex of developing rats.	Oliveira EM, Rocha JB, Sarkis JJ.	Este estudo avaliou diferentes concentrações de HgCl2 em sinaptossomas de ratos com diferentes idades.
1994	Inhibitory effect of cadmium acetate on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5; apyrase) from adult rat cerebral cortex.	Barcellos CK, Schetinger MR, Battastini AM, Silva LB, Dias RD, Sarkis JJ.	O estudo examinou os efeitos do cádmio na fração sinaptossomal do córtex cerebral de ratos Wistar machos adultos.
1995	Effects of aluminum chloride on the kinetics of rat cortex synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5).	Schetinger MR, Wyse AT, Da Silva LB, Barcellos CK, Dias RD, Sarkis JJ.	Avaliou os efeitos do cloreto de alumínio na atividade da ATP difosfoidrolase em sinaptossomas obtidos do córtex cerebral de ratos adultos.
ESTUDOS EM DIFERENTES DOENÇAS			
1998	Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidases activities in hippocampal synaptosomes of adult rats.	Bonan CD, Dias MM, Battastini AM, Dias RD, Sarkis JJ.	Avaliou o efeito de uma tarefa de memória nas ecto-enzimas sinaptossomais (ATP difosfoidrolase e 5'-nucleotidase) envolvidas na degradação do ATP à adenosina.
2000	Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats.	Frassetto SS, Schetinger MR, Schierholt R, Webber A, Bonan CD, Wyse AT, Dias RD, Netto CA, Sarkis JJ.	Avaliou os efeitos da isquemia cerebral transitória na atividade das ectonucleotidases em plaquetas de ratos.
2000	Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy.	Bonan CD, Walz R, Pereira GS, Worm PV, Battastini AM, Cavalheiro EA, Izquierdo I, Sarkis JJ.	Avaliou as atividades da ATP difosfoidrolase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas do hipocampo e do córtex cerebral em diferentes períodos após a indução do status epilepticus (SE) pela administração intraperitoneal de pilocarpina ou cainato.

2000	Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippoCampus and entorhinal cortex of adult rats.	Bonan CD, Roesler R, Pereira GS, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ.	Analisou o efeito do treinamento de esquiva inibitório sobre atividades de ectonucleotidase em sinaptossomas do hipocampo, córtex entorrinal e córtex parietal.
2002	In vitro effects of thyroid hormones on ectonucleotidase activities in synaptosomes from hippoCampus of rats.	Matos JA, Bruno AN, Oses JP, Bonan CD, Battastini AM, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ.	Avaliou a ação dos hormônios T3 e T4 nas atividades de ectonucleotidase em sinaptossomas do hipocampo.
2003	Hyperthyroidism modifies ecto-nucleotidase activities in synaptosomes from hippoCampus and cerebral cortex of rats in different phases of development.	Bruno AN, Da Silva RS, Bonan CD, Battastini AM, Barreto-chaves ML, Sarkis JJ.	Investigou os efeitos do hipertireoidismo na hidrólise do ATP e na adenosina nos sinaptossomas do hipocampo, córtex cerebral e soro sanguíneo de ratos em diferentes fases do desenvolvimento.
2003	Effects of phenylalanine and phenylpyruvate on ATP-ADP hydrolysis by rat blood serum.	Rücker B, Oses JP, Kirst IB, Berti SL, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ.	Avaliou a possibilidade de alterações na hidrólise de nucleotídeos por fenilalanina (Phe) e fenilpiruvato (PP), cujos níveis poderiam aumentar na circulação de indivíduos com fenilcetonúria.
2003	ATP diphosphohydrolase in human platelets from patients with coronary arteries heart disease.	Fürstenau CR, Trentin DS, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ.	Determinou a atividade da ATP difosfoidrolase em plaquetas de pacientes com síndromes coronarianas agudas e crônicas.
2007	The effects of angiotensin II and genetic hypertension upon extracellular nucleotide hydrolysis by rat platelet ectoenzymes.	Fürstenau CR, Trentin DS, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ.	Esclareceu os efeitos da angiotensina e da hipertensão genética na hidrólise de nucleotídeos extracelulares por ectoenzimas de plaquetas de ratos.
2008	Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats.	Fürstenau CR, Trentin DS, Gossenheimer AN, Ramos DB, Casali EA, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ.	Investigou as atividades das ectonucleotidase em soro e plaquetas de ratos hipertensos induzidos por L-NAME.
2011	Thyroid hormones alter the adenine nucleotide hydrolysis in adult rat blood serum.	Bruno AN, Carneiro-Ramos MS, Buffon A, Pochmann D, Ricachenevsky FK, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ.	Investigou os efeitos dos hormônios tireoidianos na hidrólise de nucleotídeos em soro de ratos.

CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES			
1991	Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats.	Battastini AM, da Rocha JB, Barcellos CK, Dias RD, Sarkis JJ.	Demonstrou que preparações sinaptossômicas obtidas do córtex cerebral de ratos mostram atividade ATPásica que não pode ser dissociada da atividade da ADPase, sugerindo que uma ATP-difosfoidrolase está envolvida na hidrólise de ATP e ADP.
1993	Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets.	Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JJ.	Apresentou a apirase (ATP difosfoidrolase, CE 3.6.1.5) em plaquetas no sangue de rato.
1995	Inhibition and kinetic alterations by excess free ATP and ADP of the ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets.	Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JJ.	Demonstrou que o ATP livre ou o ADP livre induz a inibição e alterações cinéticas da enzima de plaquetas no sangue de ratos.
1996	ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets.	Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AM, Dias RD, Sarkis JJ.	Demonstrou a importância fisiológica da ocorrência de uma ATP difosfoidrolase em plaquetas humanas.
1996	Sensitivity of ATPase-ADPase activities from synaptic plasma membranes of rat forebrain to lipid peroxidation in vitro and the protective effect of vitamin E	Vietta M, Frassetto SS, Battastini AM, Bello-Klein A, Moreira C, Dias RD, Sarkis JJ.	Investigou os efeitos in vitro da peroxidação lipídica da membrana sobre as atividades da ATPase-ADPase em membranas plasmáticas sinápticas do prosencéfalo de ratos.

1998	Studies on the anchorage of ATP diphosphohydrolase in synaptic plasma membranes from rat brain.	Battastini AM, Emanuelli T, Koester L, Wink MR, Bonan CD, Dias RD, Sarkis JJ.	Investigou a associação das atividades da ATPase e ADPase plasmática sináptica, expondo essa fração da membrana a três tratamentos diferentes: (a) vários agentes conhecidos por extrair seletivamente as proteínas da membrana periférica, (b) agentes separadores de proteínas de acordo com suas propriedades hidrofóbicas e (c) extração enzimática com fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) e peptidases (tripsina e papaína).
2001	Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein.	Pereira GS, Walz R, Bonan CD, Battastini AM, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR, Sarkis JJ.	Avaliou as atividades da ectonucleotidase em sinaptossomas de hipocampo e córtex cerebral de camundongos C57BL/6J.
2003	Changes in ectonucleotidase activities in rat Sertoli cells during sexual maturation.	Casali EA, de Souza LF, Gelain DP, Kaiser GR, Battastini AM, Sarkis JJ.	Investigou alterações na atividade das ectonucleotidase em células de Sertoli de ratos durante a maturação sexual.
2003	Effects of metronidazole and tinidazole on NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase from intact cells of Trichomonas vaginalis.	Tasca T, Borges FP, Bonan CD, De Carli GA, Battastini AM, Sarkis JJ.	Relatou os efeitos do metronidazol e do tinidazol na atividade da NTPDase1 e ecto-5'-nucleotidase de células intactas de Trichomonas vaginalis.
2003	The effect of stress upon hydrolysis adenine nucleotides in blood serum of rats	Böhmer AE, Fürstenau CR, Torres IL, Crema L, Battastini AM, Dalmaz C, Ferreira MB, Sarkis JJ.	Avaliou o efeito do estresse sobre a hidrólise de nucleotídeos de adenina no soro de ratos.
2003	Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of Trichomonas vaginalis.	Tasca T, Bonan CD, Carli GA, Battastini AM, Sarkis JJ.	Realizou a caracterização da atividade de ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) em células intactas de Trichomonas vaginalis.
2004	Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum.	Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rücker B, Fürstenau CR, Wink MR, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ.	Avaliou a participação de um nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase na hidrólise de nucleotídeos por soro de sangue de ratos foi avaliada.

2004	Trichomonas vaginalis: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability.	Tasca T, Bonan CD, De Carli GA, Sarkis JJ.	Investigou a localização citoquímica de uma NTPDase1 e uma ecto-5'-nucleotidase em Trychomonas vaginallis.
2006	E-NTPDase 3 (ATP diphosphohydrolase) from cardiomyocytes, activity and expression are modulated by thyroid hormone.	Barreto-Chaves ML, Carneiro-Ramos MS, Cotomacci G, Júnior MB, Sarkis JJ.	Parâmetros bioquímicos combinados e abordagens de análise de expressão gênica foram utilizados para investigar a influência da tri-iodotironina (T3) na hidrólise de ATP e ADP em cultura de cardiomiócitos.
2006	Kinetic characterization of ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in cells cultured from submandibular salivary glands of rats.	Henz SL, Ribeiro CG, Rosa A, Chiarelli RA, Casali EA, Sarkis JJ.	Avaliou-se a participação das atividades ecto-ATP difosfoidrolase (CD39; ecto-NTPDase) e ecto-5'-nucleotidase (CD73) na hidrólise de nucleotídeos por células de glândulas salivares de ratos.
2006	Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties.	Fürstenau CR, Trentin Dda S, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ.	Descreveu a atividade de ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) em plaquetas de ratos. Usando p-nitrofenil 5'-timidina monofosfato (p-Nph-5'-TMP) como substrato.
2007	Biochemical characterization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP, E.C. 3.1.4.1) from rat heart left ventricle.	Rücker B, Almeida ME, Libermann TA, Zerbini LF, Wink MR, Sarkis JJ.	Avaliou as propriedades bioquímicas dos membros da família NPP em sinaptossomas preparados a partir de ventrículos esquerdos cardíacos de ratos.
2007	Kinetic and biochemical characterization of an ecto-nucleotidepyrophosphatase/phosphodiesterase (EC 3.1.4.1) in cells cultured from submandibular salivary glands of rats.	Henz SL, Fürstenau CR, Chiarelli RA, Sarkis JJ.	Efeitos do nitrofenil 5'-timidina monofosfato (p-Nph-5'-TMP) na atividade da eto-nucleotídeo pirofosfatase / fosfodiesterase (E-NPP) em glândulas salivares de ratos.

2008	AMP hydrolysis in soluble and microsomal rat cardiac cell fractions: kinetic characterization and molecular identification of 5'-nucleotidase.	Pochmann D, Innocente AM, Cotomacci G, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ.	Descreve as propriedades enzimáticas e a identificação molecular da 5'-nucleotidase em frações solúveis e microssômicas de ventrículos cardíacos de ratos.
2008	E-NTPDases and ecto-5'-nucleotidase expression profile in rat heart left ventricle and the extracellular nucleotide hydrolysis by their nerve terminal endings.	Rücker B, Almeida ME, Libermann TA, Zerbini LF, Wink MR, Sarkis JJ.	Caracterizou as propriedades bioquímicas e atividades enzimáticas dos sinaptossomas obtidos das terminações nervosas do ventrículo esquerdo do coração.
ESTUDOS EM MODELOS DE CÂNCER			
2006	Diminution in adenine nucleotide hydrolysis by platelets and serum from rats submitted to Walker 256 tumour.	Buffon A, Ribeiro VB, Schanoski AS, Sarkis JJ.	Este estudo avaliou o padrão de hidrólise de nucleotídeos da adenina em soro e plaquetas de ratos submetidos ao modelo tumoral Walker 256.
2007	NTPDase and 5' ecto-nucleotidase expression profiles and the pattern of extracellular ATP metabolism in the Walker 256 tumor.	Buffon A, Wink MR, Ribeiro BV, Casali EA, Libermann TA, Zerbini LF, Robson SC, Sarkis JJ.	Avaliou os perfis de expressão de NTPDases e ecto-5'-nucleotidase (CD73) e o padrão de hidrólise de nucleotídeos de adenina em ratos submetidos ao modelo de tumor de Walker 256.
2007	Nucleotide metabolizing ecto-enzymes in Walker 256 tumor cells: molecular identification, kinetic characterization and biochemical properties.	Buffon A, Ribeiro VB, Wink MR, Casali EA, Sarkis JJ.	Descreveu a identificação molecular, caracterização cinética e propriedades bioquímicas de uma E-NTPDase e uma 5'-nucleotidase em células Walker 256.
EFEITO DE DIFERENTES COMPOSTOS SOBRE A HIDRÓLISE DO ATP E ADP			
1997	Free radical-induced inhibition of ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets.	Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JJ.	Investigou a suscetibilidade da atividade da ATP difosfoidrolase em plaquetas aos radicais livres.
1997	Effects of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) on ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) and 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) from rat brain synaptosomes.	Bonan CD, Battastini AM, Schetinger MR, Moreira CM, Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JJ.	Determinou o efeito da tetrahidroacridina nas ectonucleotidases em frações sinaptossomais do córtex cerebral e do hipocampo de ratos adultos.

1998	In vitro effect of central nervous system active drugs on the ATPase-ADPase activity and acetylcholinesterase activity from cerebral cortex of adult rats.	Barcellos CK, Schetinger MR, Dias RD, Sarkis JJ.	O efeito de várias drogas ativas do sistema nervoso central foi estudado in vitro sobre a atividade da ATPase-ADPase e atividade da acetilcolinesterase (AChE) do córtex cerebral de ratos adultos.
1999	Effects of suramin on hippocampal apyrase activity and inhibitory avoidance learning of rats.	Bonan CD, Roesler R, Quevedo J, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ.	Avaliou os efeitos da infusão intrahipocampal de suramina na degradação do ATP extracelular e seus possíveis efeitos nos mecanismos de memória.
2000	Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes.	Bonan CD, Amaral OB, Rockenbach IC, Walz R, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ.	Examinou o efeito do Pentilenotetrazol nas ectonucleotidases de sinaptossomal.
2001	Effect of nitric oxide donors on extracellular ATP, ADP, and AMP catabolism in rat hippocampal synaptosomes.	Kirchner SM, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ.	Efeito in vitro de doadores de óxido nítrico (NO) sobre o catabolismo extracelular de ATP, adenosina difosfato (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP) em sinaptossomas de hipocampo em ratos.
2002	Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentylenetetrazol.	Bruno AN, Oses JP, Bonan CD, Walz R, Battastini AM, Sarkis JJ.	Avaliou a hidrólise de ATP, ADP e AMP em soro de ratos após uma única injeção convulsiva de pentilenotetrazol (PTZ).
2003	Changes in nucleotide hydrolysis in rat blood serum induced by pentylenetetrazol-kindling.	Bruno AN, Oses JP, Amaral O, Coitinho A, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ.	Investigou o efeito de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol na atividade das ectonucleotidases em soro sanguíneo de ratos.
2004	NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes of hippoCampus and serum of rats subjected to homocysteine administration.	Böhmer AE, Streck EL, Stefanello F, Wyse AT, Sarkis JJ.	Este estudo investigou o efeito da administração de homocisteína nas atividades da NTPDase e 5'-nucleotidase, na fração sinaptossomal do hipocampo de ratos.
2004	The effect of ebselen on adenine nucleotide hydrolysis by platelets from adult rats.	Fürstenau CR, Spier AP, Rücker B, Luisa Berti S, Battastini AM, Sarkis JJ.	Avaliou o efeito do anti-inflamatório Ebselen na modulação da hidrólise extracelular de nucleotídeos adenina em plaquetas de ratos.

2004	Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylenetetrazol.	Oses JP, Leke R, Portela LV, Lara DR, Schmidt AP, Casali EA, Wofchuk S, Souza DO, Sarkis JJ.	Avaliou o dano astrocitário e/ou neuronal em ratos no modelo pentilenotetrazol de convulsões agudas.
2004	Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum.	Pochmann D, Rücker B, Battastini AM, Sarkis JJ.	Examinou o efeito da ovariectomia (OVX), e a administração de 17beta-estradiol, 3-sulfato de desidroisoandrosterona (DHEAS) e pregnenolona (PREG).
2006	In vitro effect of homocysteine on nucleotide hydrolysis by blood serum from adult rats	Böhmer AE, Pochmann D, Sarkis JJ.	Avaliou se a Hcy pode participar da modulação da hidrólise extracelular de nucleotídeos em soro sanguíneo de ratos.
2007	Pentylenetetrazol kindling alters adenine and guanine nucleotide catabolism in rat hippocampal slices and cerebrospinal fluid.	Oses JP, Viola GG, de Paula Cognato G, Júnior VH, Hansel G, Böhmer AE, Leke R, Bruno AN, Bonan CD, Bogo MR, Portela LV, Souza DO, Sarkis JJ.	Avaliou a hidrolise de nucleotídeos em cortes de hipocampo após injeção de Pentilenotetrazol.
2009	Influence of antidepressant drugs on Ecto-nucleotidepyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPPs) from salivary glands of rats.	Henz SL, Cognato Gde P, Vuaden FC, Bogo MR, Bonan CD, Sarkis JJ.	Avaliou o efeito de três diferentes antidepressivos nas atividades da ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP1-3) em células em cultura de glândulas salivares.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho pioneiro do Prof. Sarkis contribuiu para a formação de importantes grupos de pesquisa em todo o estado do Rio Grande do Sul. Vários de seus alunos são hoje professores e pesquisadores do CNPq e contribuem para a ciência brasileira, tanto na formação de recursos humanos, bem como na produção científica de qualidade.

É muito importante também ressaltar a importância do pioneirismo do Prof. José Marcos Ribeiro nos estudos sobre apirases em saliva de insetos no Brasil, bem como a visão científica do Prof. Sarkis. Como disse o grande Prêmio

Nobel Albert Szent-Gyorgyi: "*Discovery is seeing what everybody else has seen, and thinking what nobody else has thought*", e o Prof. Sarkis foi capaz de "pensar o que ninguém tinha pensado antes sobre algo que já tinha sido observado por vários". Essa é uma grande lição para os jovens iniciantes na carreira científica.

BREVE BIOGRAFIA

Dr. José Marcos Ribeiro é graduado em Medicina pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (1974), Mestre em Bioquímica pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro e Doutor pelo do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Ele foi professor associado da Escola de Saúde Pública da Harvard e professor do Departamento de Entomologia da Universidade do Arizona. Seu trabalho concentra-se no papel da saliva de vetores na alimentação de sangue por artrópodes, investigando a diversidade de compostos farmacologicamente ativos e novos alvos para a vacinação contra doenças transmitidas por vetores. Dr. Ribeiro trabalhou por muitos anos no programa de pesquisa em doenças tropicais da Organização Mundial de Saúde e como editor e revisor de várias revistas. Atualmente ele é investigador Sênior do "Vector Biology Section do NIAID/NIH" em Rockville, USA.

Dr. João José Freitas Sarkis era graduado em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas (1972), Mestre em Ciências Biológicas- Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1979), Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (1985) e realizou Pós-Doutorado na Universidade de Barcelona (1988). Trabalhou como pesquisador e orientador no Departamento de Bioquímica e Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFRGS, tendo publicado centenas de artigos na área da sinalização purinérgica. O Prof. Sarkis faleceu em agosto de 2007, interrompendo precocemente uma brilhante carreira científica. Em sua homenagem, o Clube Brasileiro de Purinas instituiu o "Prêmio João Sarkis" para o melhor trabalho apresentado nos encontros anuais do Clube.

REFERÊNCIAS

BARCELLOS, C. K. *et al.* In vitro effect of central nervous system active drugs on the ATPase-ADPase activity and acetylcholinesterase activity from cerebral cortex of adult rats. Gen Pharmacol. v. 31, n. 4, p. 563-7, 1998.

BARCELLOS, C. K. *et al.* Inhibitory effect of cadmium acetate on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5; apyrase) from adult rat cerebral cortex. Braz J Med Biol Res. v. 27, n. 5, p. 1111-5, 1994.

BARRETO-CHAVES, M. L. *et al.* E-NTPDase 3 (ATP diphosphohydrolase) from cardiomyocytes, activity and expression are modulated by thyroid hormone. Mol Cell Endocrinol. v. 251, n. 1-2, p. 49-55, 2006.

BATTASTINI, A. M. *et al.* Studies on the anchorage of ATP diphosphohydrolase in synaptic plasma membranes from rat brain. Int J Biochem Cell Biol. v. 30, n. 6, p. 669-78, 1998.

BATTASTINI, A. M. *et al.* Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. Neurochem Res. v. 16, n. 12, p. 1303-10, 1991.

BATTASTINI, A. M. *et al.* Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. Biochem Mol Biol Int. v. 37, n. 2, p. 209-19, 1995.

BÖHMER, A. E. *et al.* NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes of hippoCampus and serum of rats subjected to homocysteine administration. Neurochem Res. v. 29, n. 7, p. 1381-6, 2004.

BÖHMER, A. E. *et al.* The effect of stress upon hydrolysis adenine nucleotides in blood serum of rats. Pharmacol Biochem Behav. v. 75, n. 2, p. 467-71, 2003.

BÖHMER, A. E.; POCHMANN, D.; SARKIS, J. J. In vitro effect of homocysteine on nucleotide hydrolysis by blood serum from adult rats. Chem Biol Interact. v. 160, n. 2, p. 159-64, 2006.

BONAN, C. D. *et al.* Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes, Neurochem Res. v. 25, n. 6, p. 775-9, 2000.

BONAN, C. D. *et al.* Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. v. 39, n. 3, p. 229-38, 2000.

BONAN, C. D. *et al.* Effects of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) on ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) and 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) from rat brain synaptosomes. Gen Pharmacol. v. 28, n. 5, p. 761-6, 1997.

BONAN, C. D. *et al.* Effects of suramin on hippocampal apyrase activity and inhibitory avoidance learning of rats. Pharmacol Biochem Behav. v. 63, n. 1, p. 153-8, 1999.

BONAN, C. D. *et al.* Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidases activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. Neurochem Res. v. 23, n. 7, p. 977-82, 1998.

BONAN, C. D. Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippoCampus and entorhinal cortex of adult rats. Brain Res. v. 854, n. 1-2, p. 253-6, 2000.

BRUNO, A. N. *et al.* Changes in nucleotide hydrolysis in rat blood serum induced by pentylenetetrazol-kindling. Brain Res Mol Brain Res. v. 114, n. 2, p. 140-5, 2003.

BRUNO, A. N. *et al.* Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentylenetetrazol. Neurosci Res. v. 43, n. 3, p. 283-8, 2002.

BRUNO, A. N. *et al.* Thyroid hormones alter the adenine nucleotide hydrolysis in adult rat blood serum. Biofactors. v. 37, n. 1, p. 40-5, 2011.

BRUNO, N. A. *et al.* Hyperthyroidism modifies ecto-nucleotidase activities in synaptosomes from hippoCampus and cerebral cortex of rats in different phases of development. Int J Dev Neurosci. v. 21, n. 7, p. 401-8, 2003.

BUFFON A. *et al.* NTPDase and 5' ecto-nucleotidase expression profiles and the pattern of extracellular ATP metabolism in the Walker 256 tumor. Biochim Biophys Acta. v. 1770, n. 8, p. 1259-65, 2007.

BUFFON, A. *et al.* Diminution in adenine nucleotide hydrolysis by platelets and serum from rats submitted to Walker 256 tumour. Mol Cell Biochem. v. 281, n. 1-2, p. 189-95, 2006.

BUFFON, A. *et al.* Nucleotide metabolizing ecto-enzymes in Walker 256 tumor cells: molecular identification, kinetic characterization and biochemical properties. Life Sci. v. 80, n. 10, p. 950-8, 2007.

CASALI, E. A. *et al.* Changes in ectonucleotidase activities in rat Sertoli cells during sexual maturation. Mol Cell Biochem. v. 247, n. 1-2, p. 111-9, 2003.

COLOWICK, S. P.; KALCKAR, H. M. The role of myokinase in transphosphorilations. J Biol Chem. v. 148 p. 117-126, 1943.

ENGELHARDT, W. A. Enzymes as structural elements of physiological mechanisms. Proc Int Symp Enzyme Chem. v. 2, p. 163-166, 1957.

FRASSETO, S. S. *et al.* Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. Mol Cell Biochem.v. 8, n. 1, p. 47-55, 1993.

FRASSETO, S. S. *et al.* Inhibition and kinetic alterations by excess free ATP and ADP of the ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. Biochem Mol Biol Int. v.35, n.3, p. 499-506, 1995.

FRASSETTO, S. S. *et al.* Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats. Braz. J. Med. Biol. Res. v. 33, n. 11, p. 1369-1377, 2000.

FRASSETTO, S. S.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. Free radical-induced inhibition of ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. Biochem Mol Biol Int. v. 41, n. 1, p. 161-8, 1997.

FÜRSTENAU, C. R. *et al.* Ectonucleotidase activities are altered in

serum and platelets of L-NAME-treated rats. Blood Cells Mol Dis. v. 41, n. 2, p. 223-9, 2008.

FÜRSTENAU, C. R. *et al.* Ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. Platelets. v. 17, n. 2, p. 84-91, 2006.

FÜRSTENAU, C. R. *et al.* The effect of ebselen on adenine nucleotide hydrolysis by platelets from adult rats. Chem Biol Interact. v. 148, n. 1-2, p. 93-9, 2004.

FÜRSTENAU, C. R. *et al.* The effects of angiotensin II and genetic hypertension upon extracellular nucleotide hydrolysis by rat platelet ectoenzymes. Thromb Res. v. 120, n. 6, p. 877-84, 2007.

GRONDAL, E. J.; ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidase activities associated with cholinergic synaptosomes isolated from Torpedo electric organ. J Neurochem. v. 47, p.871-881, 1986.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (Solanum tuberosum). Biochem Biophys Res Commun. v.218, n.3, p. 916-23, 1996.

HENZ, S. L. *et al.* Influence of antidepressant drugs on Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPPs) from salivary glands of rats. Arch Oral Biol. v. 54, n. 8, p. 730-6, 2009.

HENZ, S. L. *et al.* Kinetic and biochemical characterization of an ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase (EC 3.1.4.1) in cells cultured from submandibular salivary glands of rats. Arch Oral Biol. v. 52, n. 10, p. 916-23, 2007.

HENZ, S. L. *et al.* Kinetic characterization of ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in cells cultured from submandibular salivary glands of rats. Cell Biol Int. v. 30, n. 3, p. 214-20, 2006.

HERBERT, E. A study of the liberation of orthophosphate from adenosine triphosphate by the stromata of human erythrocytes. J Cell Comp Physiol. v. 47, n.1, p.11-36, 1956.

HOLMSEN, I.; HOLMSEN, H. Partial purification and characterization of an ATP phosphohydrolase from human plasma. Thromb Diath Haemmor. v. 26, p. 177-191, 1971.

HORENSTEIN, A. L. *et al.* CD38/ CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. OncoImmunology. v. 2, n. 9, p. e26246. 2013.

KALCKAR, H. M. Adenylpyrophosphatase and myokinase. J Biol. Chem, v. 153, p. 355-367, 1944.

KIRCHNER, S. M. *et al.* Effect of nitric oxide donors on extracellular ATP, ADP, and AMP catabolism in rat hippocampal synaptosomes. Brain Res Bull. v. 55, n. 4, p. 469-73, 2001.

KNOWLES, A. F. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. Pur Signa. v. 7, p. 21-45, 2011.

LALIBERTE, J. F.; BEAUDOIN A. R. Sequential hydrolysis of the gamma- and beta-phosphate groups of ATP by the ATP

diphosphohydrolase from pig pancreas. Bio Bio Acta. V. 742, p. 9-15, 1983.

LEBEL, D. *et al.* Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. J Biol Chem. v. 255, p. 1227-1233, 1980.

LOHMAN, K. The isolation of various phosphoric acid compounds and their identity. Biochem J. v. 194, p. 306-327, 1928.

MATOS, J. A. *et al.* In vitro effects of thyroid hormones on ectonucleotidase activities in synaptosomes from hippoCampus of rats. Cell Mol Neurobiol. v. 22, n. 3, p. 345-52, 2002.

MEYERHOF, O. The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. J Biolo Chem. v. 157, p. 105-119, 1945.

NAGY, A. *et al.* Adenosine triphosphatase activity at the external surface of chicken brain synaptosomes. J Neurochem. v. 40, n. 1, p. 226-34, 1983.

NAGY, A. K., *et al.* Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: identification and enzymic characterization. J Neurochem, v. 47, v. 3, p. 976-986, 1986.

OLIVEIRA, E. M. *et al.* In vitro and in vivo effects of HgCl2 on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from cerebral cortex of developing rats. Arch Int Physiol Biochim Biophys. v. 102, n.5, p. 251-4, 1994.

OSES, J. P. *et al.* Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylenetetrazol. Brain Res. Bull. v. 64, n. 3, p. 237-42, 2004.

OSES, J. P. *et al.* Pentylenetetrazol kindling alters adenine and guanine nucleotide catabolism in rat hippocampal slices and cerebrospinal fluid. Epilepsy Res. v. 75, n. 2-3, p. 104-11, 2007.

OSES, J. P. *et al.* Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. Life Sci. v. 74, n. 26, p. 3275-84, 2004.

PEREIRA, G. S. *et al.* Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein. Neurosci Lett. v. 301, n. 1, p. 72-4, 2001.

PILLA, C. *et al.* ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. Platelets. v. 7, n. 4, p. 225-30, 1996.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. Int Rev Cytol. v.158, p.141-214. Review, 1995.

POCHMANN, D. *et al.* AMP hydrolysis in soluble and microsomal rat cardiac cell fractions: kinetic characterization and molecular identification of 5'-nucleotidase. Biosci. Rep. v. 28, n. 5, p. 267-73, 2008.

POCHMANN, D. *et al.* Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum. Thromb Res., v. 114, n. 4, p. 275-81, 2004.

RIBEIRO, J. M. *et al.* Characterization of the salivary apyrase activity of three rodent flea species. Comp Biochem Physiol. v. 95B, p. 215-219, 1990.

RIBEIRO, J. M. *et al.* Salivary apyrase of Aedes aegypti: characterization and

secretory fate. Comp Biochem Physiol B. v.7, p. 81-86, 1984.

RIBEIRO, J. M.; GARCIA, E. S. The salivar and crop apyrase acitivity of Rhodnius prolixus. Insect Physiology. v.26, p.303-307, 1980.

RIBERO, J. M. *et al.* Salivary apyrase activity of same old world phlebotomine sandflies. Insect Biochemistry. v.19, p. 409-412, 1989.

ROBSON, S. C. *et al.* The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. Pur Signal. v. 2, p. 409-430, 2006.

ROCHA, J. B. *et al.* Effects of chronic treatment with high doses of chlorpromazine on ATP and ADP hydrolysis by synaptosomal fractions from the rat caudate nucleus. Braz J Med Biol Res. V. 23, n. 10, p. 969-73. 1990.

ROCHA, J. B. *et al.* Undernutrition during the preweaning period changes calcium ATPase and ADPase activities of synaptosomal fractions of weanling rats. Br J Nutr. v. 63, n. 2, p.273-83. 1990.

ROSSATTO, E. R. *et al.* ATP diphosphohydrolase in human platelets from patients with coronary arteries heart disease. Platelets. v. 14, n. 1, p. 47-52, 2003.

RÜCKER B. *et al.* Biochemical characterization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP, E. C. 3.1.4.1) from rat heart left ventricle. Mol Cell Biochem. v. 306, n. 1-2, p. 247-54, 2007.

RÜCKER, B. *et al.* Effects of phenylalanine and phenylpyruvate on ATP-ADP hydrolysis by rat blood serum. Amino Acids. v. 24, n. 4, p. 383-8, 2003.

RÜCKER, B. *et al.* E-NTPDases and ecto-5'-nucleotidase expression profile in rat heart left ventricle and the extracellular nucleotide hydrolysis by their nerve terminal endings. Life Sci. v. 82, n. 9-10, p. 477-86, 2008.

SARKIS, J. J. *et al.* Salivary apyrase of Rhodnius prolixus. Kinetics and purification. Biochem J. v. 233, p. 885-891, 1986.

SCHADECK, R. J. *et al.* Synaptosomal apyrase in the hypothalamus of adult rats. Braz J Med Biol Res. v. 22, n. 3, p. 303-14, 1989.

SCHETINGER, M. R. *et al.* Effects of aluminum chloride on the kinetics of rat cortex synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5). Biol Trace Elem Res. v. 50, n. 3, p. 209-19, 1995.

SCHOMBURG, I. *et al.* BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. Nuc Ac Res. v. 32, p. D431-D433, 2004.

TASCA, T. *et al.* Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of Trichomonas vaginalis. Exp Parasitol. v. 105, n. 2, p. 167-73, 2003.

TASCA, T. *et al.* Effects of metronidazole and tinidazole on NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase from intact cells of Trichomonas vaginalis. FEMS Microbiol Lett. v. 226, n. 2, p. 379-84, 2003.

TASCA, T. *et al.* Trichomonas vaginalis: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on

cellular viability. Parasitol Res. v. 93, n. 4, p. 300-3, 2004.

VALENZUELA, M. A. *et al.* Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. Comp Biochem Physiol B. v. 93, n. 4, p.911-919, 1989.

VIETTA, M. *et al.* Sensitivity of ATPase-ADPase activities from synaptic plasma membranes of rat forebrain to lipid peroxidation in vitro and the protective effect of vitamin E. Neurochem Res. v. 21, n. 3, p. 299-304, 1996.

WANG, T. F. *et al.* Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. Brain Res Mol Brain Res. v. 47, p. 295-302, 1997.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto-(Ca2+, Mg2+)-apyrase. J Biol Chem. v.271, n.17, p. 9898-901, 1996.

WINK, M. R. *et al.* Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. Cancer Lett. v. 198, n. 2, p. 211-8, 2003.

WINK, M. R. *et al.* Thyroid hormone upregulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 in C6 rat glioma cells. Mol Cell Endocrinol. v. 205, p. 107-14, 2003.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. Biochem J. v. 15, p. 345-365, 1992.

ZIMMERMANN, H. *et al.* Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. Pur Signal, v. 8, p. 437-502, 2012.

ZIMMERMANN, H. *et al.* Hippocampal localization of 5'-nucleotidase as revealed by immunocytochemistry. Neuroscience. v. 55, n. 1, p. 105-112, 1993.

ZIMMERMANN, H. *et al.* Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface. *In*: Vanduffel L.; Lemmens R. (ed.). Ecto-ATPases and related ectonucleotidases. Shaker Publishing B. V., Maastricht, The Netherlands, 2000.

ASPECTOS HISTÓRICOS SOBRE O ESTUDO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS NO BRASIL

Robson Coutinho-Silva
Roberto Paes de Carvalho

ESTUDO DOS RECEPTORES PARA ADENOSINA

Adenosina e AMP cíclico na retina: como começou essa história?

Em 1978, Fernando Garcia de Mello, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ), foi convidado a apresentar seu trabalho em reunião da Academia de Ciências do Vaticano, na época dirigida por Carlos Chagas Filho. Foi uma reunião importante, com a presença de vários ganhadores do Prêmio Nobel, incluindo Rita Levi-Montalcini, descobridora do fator de crescimento de nervo (NGF), e Marshall Nirenberg, descobridor do código genético, com quem Fernando havia trabalhado no *National Institutes of Health*, Estados Unidos. Fernando apresentou seu trabalho com dados novos sobre dopamina e produção de AMP cíclico durante o desenvolvimento da retina. Após sua apresentação, um dos convidados que estavam na audiência, Dr. Geoffrey Burnstock, descobridor do chamado sistema purinérgico, perguntou se Fernando havia experimentado aplicar adenosina em sua preparação de retina. Os trabalhos apresentados na reunião foram publicados nos "Scripta Varia" da Academia (De Mello, 1980), acompanhado das perguntas da plateia, inclusive a pergunta singela de Burnstock. Após a volta de Fernando ao laboratório, ele e seu aluno de iniciação científica (IC) Roberto Paes de Carvalho realizaram os experimentos com retinas de

embriões de galinha, os quais demonstraram, pela primeira vez, a existência de receptores de adenosina acoplados à produção de AMP cíclico na retina. Roberto lembra-se de que ficou emocionado quando os resultados saíram a partir de contagens no cintilador e ficou muito estimulado a prosseguir este novo projeto, especialmente em estudar a ontogênese do efeito da adenosina e a caracterização dos receptores envolvidos. Uma surpresa para eles foi a diferença do nível basal de AMP cíclico quando usavam diferentes inibidores de fosfodiesterase, o IBMX e o RO-201724, com o nível cerca de 3 vezes mais alto quando utilizavam RO-201724. Fernando trouxe uma informação nova na época: o IBMX era um antagonista de receptores de adenosina, além de ser inibidor de fosfodiesterase. Realizaram então experimentos mostrando que tanto o IBMX quanto a adenosina deaminase, uma enzima que catalisa a conversão de adenosina em inosina, eram capazes de diminuir o nível basal de AMP cíclico em retinas incubadas com RO20-1724. Isso evidenciava o fato de que o nível mais alto obtido com o RO20-1724 era devido à liberação de adenosina pelo tecido e subsequente ativação de receptores acoplados positivamente à adenilil ciclase.

Verificaram também que, na presença de RO20-1724 e adenosina deaminase, a incubação com o análogo de adenosina 2-cloroadenosina, resistente à ação da adenosina deaminase, era capaz de aumentar o nível de AMP cíclico. Mostraram que o efeito da adenosina aparecia somente por volta do dia 13 de desenvolvimento do embrião (E13), um período marcado por intensa formação de sinapses na retina. O acúmulo de AMP cíclico aumentava em idades subsequentes e atingia um máximo por volta de E17. Depois desse período, o acúmulo diminuía progressivamente e era bem menor no período pós-eclosão. Como Fernando tinha caracterizado anteriormente o acúmulo de AMP cíclico induzido por dopamina na retina, neste estudo também procuraram verificar se o efeito da adenosina era mediado pela liberação de dopamina, especialmente porque o efeito da adenosina aparecia em período do desenvolvimento em que ocorria a formação de sinapses. Utilizando antagonistas de receptores dopaminérgicos, mostraram que o efeito da adenosina era independente da dopamina. Assim, o estudo da ontogênese do efeito da dopamina e o da adenosina mostrou que eles têm um perfil de desenvolvimento diferente, estando o da dopamina já presente em E7 e o da adenosina somente sendo observado em E13.

O grupo mostrou que a adenosina promovia acúmulo de AMP cíclico em culturas de retina do mesmo modo que a dopamina. Nessas culturas, incubação

prolongada com dopamina ou adenosina induzia a um decréscimo do acúmulo de AMP cíclico quando eram lavadas e estimuladas com cada uma das substâncias. Essa foi uma das primeiras demonstrações claras de que esses sistemas podiam sofrer um processo de "*down-regulation*" de receptores, o que levou à publicação do trabalho no PNAS, em 1982, intitulado *Regulation of dopamine and adenosine--dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture*. A autoria foi de Maria Christina de Mello, Ana Ventura, Willian Klein, Fernando de Mello e Roberto Paes de Carvalho (De Mello *et al.*, 1982). O trabalho sobre a adenosina e o acúmulo de AMP cíclico durante o desenvolvimento da retina, com o título *Adenosine-elicited accumulation of adenosine 3'-5' – cyclic-monophosphate in the chick embryo retina*, foi publicado no *Journal of Neurochemistry* no mesmo ano de 1982, em coautoria de Roberto Paes de Carvalho e Fernando de Mello (Paes de; De Mello, 1982).

Interação adenosina-dopamina

Devido à existência de dois sistemas de sinalização na retina acoplados à produção de AMP cíclico, o dependente de adenosina e o dependente de dopamina, o grupo estudou a interação entre eles. A adição conjunta de dopamina e adenosina em concentrações saturantes ou sub-saturantes não levava a um aumento aditivo de AMP cíclico, como era de se esperar caso os dois sistemas fossem independentes. Na época, existia na literatura trabalhos mostrando a existência de um receptor de adenosina acoplado negativamente à adenilil ciclase, denominado receptor A1. Uma pergunta do grupo foi se os receptores A1 também estariam expressos na retina, produzindo inibição da produção de AMP cíclico. Mostraram, então, que adenosina inibia a produção de AMP cíclico estimulada por dopamina em estágio embrionário precoce, em que não há estímulo por este nucleosídeo. Em seguida, caracterizaram esse efeito como mediado por receptores A1, baseados em critérios farmacológicos, especialmente a ordem de potência de diferentes análogos. Uma inibição máxima de 70% do estímulo com dopamina era observada, indicando a existência de uma população de receptores de dopamina (30%) que não seria modulada via receptores A1.

Outro achado interessante foi que a adenosina não inibia o estímulo por apomorfina, um agonista parcial de dopamina, em nenhuma fase do desenvolvimento

embrionário, inclusive no período pós-eclosão. O estímulo por apomorfina era cerca de 30% daquele observado para a dopamina e constante durante o desenvolvimento, sendo semelhante ao da dopamina no período pós-eclosão. Os resultados sugeriram a existência de duas populações diferentes de receptores de dopamina durante o desenvolvimento da retina: uma população presente em idades precoces do desenvolvimento (D1E), que produz aumento grande de AMP cíclico e que pode ser modulada por receptores A1; e outra, estimulada também por apomorfina, com expressão constante durante o desenvolvimento, que não era modulável por receptores A1 (D1). Uma evidência para esse modelo foi a ausência de inibição por dopamina ou apomorfina em retinas do período pós-eclosão, indicando que D1E desaparecia nesse período.

Esse trabalho, que mostrava a existência dos receptores A1 na retina e sua caracterização farmacológica e desenvolvimento, foi publicado, em 1985, no *Journal of Neurochemistry* com o título *Expression of A1 adenosine receptors modulating dopamine-dependent cyclic AMP accumulation in the chick embryo retina*, por Roberto Paes de Carvalho e Fernando G. de Mello (Paes de; De Mello, 1985). Uma pergunta gerada por esse trabalho era qual a função desempenhada pelos receptores D1E. Outra pergunta questionava se os receptores A1 realmente não eram mais expressos no período pós-eclosão ou continuavam a existir, mas não mais acoplados à inibição da adenilil ciclase. Para tentar responder à primeira pergunta sobre receptores D1E, Fernando e Christina de Mello trabalharam por um período de 2 anos (1985-1987) no laboratório do Dr. William Klein da *Northwestern University*, Estados Unidos. Mostraram que a dopamina inibia crescimento de neuritos e motilidade de cones de crescimento em neurônios de retina através de receptores D1 acoplados à produção de AMP cíclico, evidenciando, pela primeira vez, um efeito da dopamina em idades precoces do desenvolvimento do sistema nervoso. Esse trabalho foi publicado por Karen L. Lankford, Fernando G. de Mello e William Klein em 1988 (Lankford et al, 1988).

Enquanto isso, o já professor na UFF Roberto Paes de Carvalho utilizou a técnica de "*binding*" (ligação) para ter uma evidência mais direta do desenvolvimento e expressão dos receptores A1 na retina. Roberto utilizou o análogo ciclohexiladenosina (CHA) marcado com trítio e conseguiu detectar sua ligação a receptores A1. Foi mostrado que esse análogo, que também inibia a produção de AMP cíclico induzida por dopamina, apresentava ligação homogênea e a uma única classe de sítios tanto em homogeneizados de retinas pós-eclosão quanto

em E12. A ontogênese dos receptores mostrou sua presença desde E10, crescendo até E17 e decrescendo no período pós-eclosão. No entanto, para sua surpresa, o nível de receptores no período pós-eclosão ainda era muito alto, apesar de não ser mais detectada a inibição por adenosina do acúmulo de AMP cíclico induzido por dopamina nesse período. Isso indicava que os receptores estavam presentes, mas não acoplados à adenil-ciclase ou à atividade dessa enzima estimulada por dopamina.

Experimentos foram feitos no período pós-eclosão, quando se observou que CHA era capaz de inibir a produção de AMP cíclico induzida por forskolina, um estimulador direto da adenilil ciclase, e não por dopamina. Além disso, experimentos de binding utilizando GppNHp, um análogo não hidrolisável de GTP, em diversas idades embrionárias, mostraram que os receptores A1 estão acoplados a proteínas G em todos os períodos do desenvolvimento da retina, inclusive no pós-eclosão. Portanto, os dados indicaram que os receptores A1 continuavam expressos no período pós-eclosão, mas não mais acoplados à modulação do efeito da dopamina, e reforçaram a hipótese da existência de D1E. Esse trabalho foi publicado, em 1990, no *Journal of Neuroscience Research*, com o título *Development of A1 adenosine receptors in the chick embryo retina* (Paes de, 1990).

Localização de receptores A1, transportadores de adenosina e da própria adenosina na retina: uma saga americana

Um projeto que Roberto Paes de Carvalho desenvolveu em seu pós-doutorado nos Estados Unidos, aproveitando a "expertise" dos laboratórios de Solomon Snyder e Ruben Adler na Universidade Johns Hopkins, foi a análise autorradiográfica e imunocitoquímica da adenosina e seus receptores e transportadores durante o desenvolvimento da retina. Para localizar os receptores e transportadores, utilizaram a técnica de autorradiografia e conseguiram evidenciar os receptores A1 nas regiões plexiformes da retina desde E12 até o período pós-eclosão em quantidades crescentes, como observado nos experimentos anteriores de *binding*. Conseguiram também detectar a expressão de transportadores de adenosina que já estão presentes na retina desde E8 com uma distribuição dispersa em toda a extensão da retina, que nesta idade ainda não apresenta camadas plexiformes bem distinguíveis. De modo interessante, os transportadores passam a ser localizados

preferencialmente nas regiões plexiformes a partir de E12 e até o período pós-eclosão. Utilizando um anticorpo contra adenosina, mostraram que o nucleosídeo não está presente em retinas E8, mas em E15 e no período pós-eclosão em células localizadas na camada nuclear interna, na posição das células amácrinas, e na camada de células ganglionares e também nos fotorreceptores. Esse trabalho, intitulado *Developmental regulation of adenosine A1 receptors, uptake sites and endogenous adenosine in the chick retina*, foi publicado por Roberto na revista Developmental Brain Research, em 1992, em colaboração com Karen Braas, Ruben Adler e Solomon Snyder (De Carvalho *et al.*, 1992).

A saga americana continua: estudos adenosinérgicos nas culturas do Ruben

As culturas purificadas de neurônios de retina usadas no laboratório de Ruben Adler propiciaram a realização de estudos de captação e liberação de adenosina através de cintilação líquida e autorradiografia. Os resultados mostraram que os neurônios em cultura captavam adenosina de maneira dependente de tempo e concentração, o que podia ser inibido pelos bloqueadores do transporte NBI ou dipiridamol. A autorradiografia e a imunocitoquímica revelaram que fotorreceptores e cerca da metade dos outros neurônios captavam adenosina ou apresentavam o nucleosídeo endógeno. A adenosina tritiada captada pelas células também podia ser liberada por exposição a concentrações despolarizantes de potássio. Muito interessante foi o fato de tal liberação ter sido completamente bloqueada por inibidor de canais de cálcio dependentes de voltagem, revelando uma liberação cálcio-dependente de adenosina e indicando um mecanismo clássico vesicular de liberação. A análise por HPLC do material liberado revelou uma maior proporção de inosina (70%), com níveis menores de hipoxantina, adenosina e nucleotídeos. Esse trabalho foi publicado, em 1990, no *Journal of Neurochemistry*, com o título *Analysis of adenosine immunoreactivity, uptake and release in purified cultures of developing chick embryo retinal neurons and photoreceptors*. Seus autores foram Roberto Paes de Carvalho, Karen Braas, Solomon Snyder e Ruben Adler (Paes de *et al.*, 1990).

Continuando a liberar adenosina no Brasil

De volta ao Brasil, Roberto e seu grupo estudaram o efeito de neurotransmissores, em especial o glutamato, sobre a liberação de purinas nas culturas purificadas. Houve muitas dificuldades para realizar esses experimentos devido às condições adversas para realizar culturas e por não haver na época alunos de pós-graduação em dedicação integral ao projeto na UFF. Apesar disso, um importante trabalho para o grupo, cujo título era *Activation of glutamate receptors promotes a calcium-dependent and transporter-mediated release of purines in cultured avian retinal cells: Possible involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*, foi publicado no *Neurochemistry International*, em 2005, em coautoria com os alunos de IC Bruno Vieira Dias, Rochele Alberto Martins, Mariana Rodrigues Pereira, Camila Cabral Portugal e Claudia Lanfredi (Paes de Carvalho *et al.*, 2005). Eles mostraram, neste estudo, que o glutamato promovia liberação de purinas através da ativação de receptores NMDA ou AMPA/Kainato. Também foram analisados os componentes metabólicos captados e liberados em condições basais ou estimuladas por glutamato. Enquanto 85% da radioatividade permanecia como adenosina no meio extracelular em 15 minutos de exposição às células, mais de 95% da radioatividade intracelular correspondia a nucleotídeos, evidenciando uma intensa atividade de adenosina cinase. De modo interessante, a análise do material liberado revelou que a maior parte da radioatividade correspondia à inosina, de modo semelhante ao observado na liberação de purinas por altas concentrações de potássio em culturas purificadas como descrito anteriormente. Outros resultados muito importantes também foram reportados no estudo. A liberação induzida por glutamato ou kainato foi completamente inibida em ausência de cálcio no meio extracelular, mostrando que a liberação era dependente de cálcio. No entanto, a liberação foi bloqueada por NBI, inibidor do transporte de adenosina.

Esses resultados pareceram inicialmente contraditórios, uma vez que a liberação dependente de cálcio é comumente relacionada com a liberação vesicular de neurotransmissores. Mas uma possibilidade seria que a liberação fosse mediada pelo transportador e que este seria regulado por algum evento dependente de cálcio. De fato, observaram uma inibição completa e concentração-dependente da liberação induzida por NMDA ou kainato e também da captação de adenosina por KN62, KN93 ou um peptídeo meristoilado inibidor específico da CAMKII.

De modo interessante, tais compostos foram eficazes em inibir a captação de adenosina, mas não a de GABA ou colina, indicando a especificidade do efeito. Além disso, não foram observados efeitos dos inibidores sobre o metabolismo da adenosina, sugerindo sua atuação direta ou indireta sobre o transporte de adenosina. Em conclusão, esses resultados sugeriram que o processo de liberação de purinas por glutamato em culturas de retina era mediado por ativação de receptores NMDA ou AMPA/Kainato, influxo de cálcio e ativação da CAMKII. Essa ativação, direta ou indiretamente, era capaz de induzir a liberação de purinas através do transportador.

Estudo da captação de adenosina em neurônios e células gliais da retina em cultura

A presença de células gliais nas culturas levantou a questão de quanto dos efeitos seria na glia. No caso da adenosina, investigavam se os receptores e transportadores eram expressos na glia ou quais efeitos teria a ativação desses receptores na glia. Em 2011, foi publicado o trabalho *Differential adenosine uptake in mixed neuronal/glial or purified glial cultures of avian retinal cells: Modulation by adenosine metabolism and the ERK cascade na Biochemical and Biophysical Research Communications*, de autoria de Alexandre dos Santos Rodrigues, Jainne Martins Ferreira e Roberto Paes de Carvalho (Dos Santos Rodrigues *et al.*, 2011).

Nesse trabalho, utilizando culturas mistas e culturas purificadas de glia de retina, os autores observaram que a captação de adenosina ocorria na glia. Os dados indicaram a existência de diferentes tipos de transportadores nas culturas como ENT1, sensível à inibição por NBI, e também o ENT2, insensível ao NBI. A captação também foi inibida pela incubação prévia da adenosina tritiada com adenosina deaminase, indicando que é específica para adenosina. Além disso, iodotubercidina, inibidor de adenosina cinase, inibiu a captação mostrando a importância do metabolismo como uma força de direcionamento para este tipo de transporte equilibrativo.

Outro resultado interessante registrado nesse artigo foi a inibição do transporte por inibidores seletivos da via das MAP kinases (especificamente da MEK), que não tiveram efeito no metabolismo intracelular da adenosina, mostrando que essa via de sinalização está envolvida direta ou indiretamente na atividade do transportador, de modo semelhante ao observado anteriormente para a CAMK II.

Voltando um pouco no tempo: Regulação da sobrevivência neuronal por adenosina

Por volta do ano de 1994, foram feitos experimentos utilizando culturas purificadas de neurônios e culturas mistas de retina tratadas prolongadamente com adenosina para verificar se ocorria efeito nos receptores de adenosina e na liberação de adenosina. As culturas mistas normalmente têm seu meio trocado em virtude da alta densidade de células, mas as culturas purificadas não. Quando, inadvertidamente, trocou-se o meio das culturas purificadas e não das mistas, observou-se que as purificadas apresentavam intensa morte celular, mas que isso não ocorria nas culturas tratadas com adenosina, sugerindo um papel neuroprotetor da adenosina sobre o evento de morte celular induzido pela troca de meio.

Esse trabalho foi continuado por Gabriel Andrade Maia, aluno de IC da Medicina, e, mais tarde, pela mestranda Jainne Martins Ferreira. Verificou-se que a troca do meio induzia uma morte celular de cerca de 50% dos neurônios, inclusive de fotorreceptores. Um efeito de morte semelhante ocorria pela incubação com adenosina deaminase, sem troca de meio, um efeito bloqueado por EHNA, um inibidor da enzima, sugerindo que adenosina atuava como um fator trófico para os neurônios. Essa sugestão foi também corroborada pela descoberta de que o NBI, bloqueador da captação de adenosina, promovia efeito neuroprotetor semelhante à adenosina.

Outro achado importante foi a necessidade de uma pré-incubação de, pelo menos, 24 horas antes da troca de meio para obter-se o resultado neuroprotetor, sugerindo que algum evento de longa duração, por exemplo, a síntese de proteínas, era importante para desencadear a neuroproteção. O receptor de adenosina envolvido no fenômeno era o A2A, pois o agonista CGS21680, mas não o agonista A1 CHA, promovia o mesmo efeito. O análogo permeável de AMPc 8-Bromo AMP cíclico tinha o mesmo efeito protetor, corroborando o achado de que o receptor A2A, acoplado positivamente à adenilil ciclase, é o receptor envolvido. A troca por um meio condicionado obtido de uma cultura irmã, em contraposição ao meio fresco utilizado nos experimentos anteriores, não induzia morte celular, sugerindo que fatores presentes nesse meio eram suficientes para promover a neuroproteção.

Esse trabalho, cuja autoria era de Roberto Paes de Carvalho, Gabriel Maia e Jainne Ferreira, foi publicado, em 2003, na *Neurochemical research*, com o título

Adenosine Regulates the Survival of Avian Retinal Neurons and Photoreceptors in Culture (Paes de Carvalho *et al.*, 2003).

Excitotoxicidade do glutamato também é bloqueada por adenosina

Em 1998, Jainne Martins Ferreira iniciou experimentos com glutamato e neuroproteção por adenosina. Em culturas purificadas de neurônios, mostrou que a adição de glutamato promovia uma grande morte celular, que podia ser fortemente atenuada por adenosina. O trabalho foi publicado na revista Brain Research, em 2001, com o título *Long-term activation of adenosine A receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons*, com autoria de Jainne M. Ferreira e Roberto Paes de Carvalho (Ferreira; Paes de Carvalho, 2001).

Inicialmente, mostrou-se que a toxicidade do glutamato nas culturas podia ser inibida tanto por MK801, bloqueador do canal NMDA, como por DNQX, antagonista AMPA/kainato. No entanto, o efeito do Kainato também era fortemente inibido por MK801, evidenciando um efeito preponderante via receptor NMDA. O efeito tóxico do glutamato era máximo em 24 horas e em concentrações na faixa de 50 µM. A pré-incubação das culturas por 48 horas com adenosina e EHNA, inibidor de adenosina deaminase, ou com NBI bloqueou a morte celular induzida por glutamato ou kainato. Os análogos permeáveis de AMP cíclico 8-bromo e Sp-AMP cíclico tiveram efeito semelhante, assim como os agonistas A2A CGS 21680 e DPMA, mas não o agonista A1 CHA. Os resultados mostraram que a ativação crônica dos receptores A2A bloqueava a excitotoxicidade do glutamato de modo semelhante ao que ocorria com a troca do meio.

Adenosina tem vida dupla dependendo da fase do desenvolvimento

Culturas purificadas de neurônios são realizadas a partir de retinas de embriões em E8 e contém cerca de 30% de fotorreceptores e o restante de outros neurônios de diferentes polaridades. Ruben Adler e colaboradores mostraram que, quando as culturas eram realizadas a partir de retina de E6, a proporção de fotorreceptores crescia para cerca de 80/90%. Esses resultados foram interpretados através de um modelo chamado *default pathway* em que a via predominante de diferenciação das células da retina era em direção a fotorreceptores e a

diferenciação para outras células dependeria de fatores instrutores que seriam produzidos e liberados no correr do desenvolvimento (Adler; Hatlee, 1989). Portanto, a diminuição do número de fotorreceptores nas culturas em E8 quando comparadas com culturas E6 ocorreria devido à exposição das células aos diferentes fatores antes de serem semeadas nas culturas.

Estudos com as culturas E6 foram feitos com o intuito inicial de verificar se diferentes neurotransmissores teriam efeito instrutor nesse modelo. Surpreendentemente, quando se adicionava adenosina ou agonistas A2A nas culturas E6 no primeiro dia de cultura, observou-se uma intensa morte celular, ao contrário do descrito anteriormente para as culturas E8 em que a ativação do receptor A2A promovia sobrevivência celular. De modo interessante, o efeito de morte é mediado por PKC e não por PKA, e, enquanto a ativação do receptor A2A inibia a fosforilação da CREB em culturas E6 via PKC, essa ativação induzia aumento da fosforilação da CREB em culturas E8 via PKA. Estudos "in vivo" foram também realizados nas idades correspondentes do desenvolvimento embrionário. A injeção "in ovo" do agonista A2A induziu desfosforilação da CREB e morte celular na retina E9 quando injetado em E6, principalmente na camada de células ganglionares. O contrário, isto é, aumento da fosforilação da CREB, foi observado em retinas E11 quando o ovo injetado continha o embrião em E8.

Esses resultados foram publicados no *Journal of Neurochemistry*, em 2011, com o título *Developmental regulation of neuronal survival by adenosine in the in vitro and in vivo avian retina depends on a shift of signaling pathways leading to CREB phosphorylation or dephosphorylation*, de autoria de Renato Socodato, Rafael Brito, Karin Calaza e Roberto Paes de Carvalho (Socodato *et al.*, 2011).

Regulação da expressão dos receptores A1: uma outra história

Como relatado anteriormente, os receptores A1 de adenosina são expressos na retina desde fases precoces do desenvolvimento embrionário modulando negativamente a atividade da adenilil ciclase. No entanto, esses receptores não pareciam ser expressos nas culturas densas em mocamada, pois não era detectada inibição por agonistas A1 do acúmulo de AMP cíclico estimulado por dopamina. De modo interessante, essa inibição podia ser detectada em culturas de agregados de retina na mesma idade embrionária, indicando que a expressão de

tais receptores estava sob regulação de contactos celulares ocorrendo nos agregados (que apresentam padrão histotípico organizado semelhante ao tecido *in vivo*), mas não nas culturas em monocamada. A incubação prolongada das culturas, tanto com análogos permeáveis de AMP cíclico como 8-bromo e Sp AMP cíclico quanto com forskolina, um ativador direto da adenilil ciclase, promovia aumento marcante da expressão de receptores A1, quando detectados por ensaio de "*binding*".

Em concordância com os dados relatados, a exposição das células a agonistas A2A promovia um aumento semelhante na expressão de receptores A1 e esse efeito era dependente de PKA e síntese proteica. Além disso, a incubação prolongada das culturas com agonistas A2A promovia aumento dos receptores A1 e, concomitantemente, uma diminuição da expressão dos receptores A2A, sugerindo que a expressão dessas duas classes de receptores apresenta uma regulação recíproca. Esse estudo foi publicado, em 2010, no *Journal of Neurochemistry*, com o título *Modulation of A1 adenosine receptor expression by cell aggregation and long-term activation of A2A receptors in cultures of avian retinal cells: Involvement of the cyclic AMP/PKA pathway*, cuja autoria era de Mariana Rodrigues Pereira, Vanusa Rocha Hang, Eliza Vardiero, Fernando G. de Mello e Roberto Paes de Carvalho (Pereira *et al.*, 2010).

O INÍCIO DO ESTUDO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NO BRASIL

O estudo dos receptores purinérgicos P2 no Brasil teve seu início com os trabalhos pioneiros do professor Pedro Muanis Persechini do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ, no início da década de 90. Persechini estudava, na década de 80, propriedades eletrofisiológicas de membranas de macrófagos. Nessa ocasião, ele descreveu canais de potássio ativados por Ca^{2+} em macrófagos e células multinucleadas (Persechini et al, 1981; Persechini; Oliveira Castro, 1987). Em 1986, realizou seu Pós-Doutorado na *Rockfeller University*, sob supervisão do Dr. John Ding-E Young, referência internacional em mecanismos efetores de citotoxidade de linfócitos. Dr. Persechini participou da descoberta da perforina, molécula formadora de poros em linfócitos citotóxicos, secretada

junto com granzima e envolvida em atividades de citotoxidade mediada por célula (Jiang *et al.*, 1988; Kwon *et al.*, 1989; Persechini; Young, 1988; Young *et al.*, 1988). Na ocasião, assistira, na *Rockfeller University*, a uma conferência cuja abordagem era os efeitos do ATP extracelular em macrófagos, que incluía a ativação de uma possível molécula formadora de poro. Como ele estudava canais iônicos em macrófagos e moléculas formadoras de poros, foi desafiador pensar na ideia de estudar canais iônicos induzidos por ATP em macrófagos.

Ao retornar ao Brasil, colocou em prática sua ideia e, usando a técnica de eletrofisiologia de *Patch clamp*, o grupo do professor Pedro Persechini descreveu respostas bifásicas de correntes elétricas em função do tratamento com ATP sendo uma despolarizante e outra hiperpolarizante (Albuquerque *et al.*, 1993). Na ocasião, a corrente hiperpolarizante foi atribuída a canais de potássio dependente de cálcio, associado posteriormente aos receptores P2Y, e a corrente despolarizante e pouco dessensibilizante, a canais não seletivos a cátions monovalentes e atribuídos, posteriormente, aos receptores P2X7. Ele estava determinado em caracterizar o poro induzido por ATP nos macrófagos e apresentou ao então aluno de pós-graduação Robson Coutinho-Silva, coautor deste capítulo, o desafio de caracterizar os canais unitários das correntes elétricas induzidas por ATP em macrófagos. Não foi uma tarefa fácil.

Em continuidade à pesquisa de possíveis canais iônicos ativados por ATP em macrófagos, passaram a buscar registros unitários de atividades elétricas no limite de detecção da técnica *Patch clamp*. Entretanto, o registro ideal sem ruído, com uso de micropipetas especiais e impermeabilizadas manualmente uma a uma, só foi feito depois de dois anos de sucessivas tentativas em abordagens experimentais exaustivamente exploradas. Paralelamente, o grupo estava investigando atividades elétricas de outras células do sistema imune e descreveu respostas eletrofisiológicas induzidas por ATP em células fagocíticas do retículo tímico com características de células dendríticas (Coutinho Silva, R. *et al.*, 1996a), respostas essas análogas àquelas anteriormente registradas em macrófagos.

O professor Persechini explorou a possibilidade de existência de junções comunicantes entre macrófagos justapostos. À época, havia relatos na literatura sugerindo que o fenômeno da permeabilização induzida por ATP pudesse estar relacionado à abertura de hemicanais de junções comunicantes de conexina-43. O grupo demonstrou o acoplamento elétrico de macrófagos justapostos pela técnica de *double patch clamp*. Os resultados obtidos na ocasião apontaram,

entretanto, que não havia correlação entre a abertura de hemicanais por conexina-43 e o fenômeno da permeabilização induzida por ATP (Alves *et al.*, 1996).

Finalmente, em 1995, o grupo do professor Persechini conseguiu o registro do canal unitário responsável pela corrente de despolarização induzida por ATP tanto em macrófagos como também em células fagocíticas do retículo tímico (Coutinho Silva, R. *et al.*, 1996b). Esse trabalho foi pioneiro ao descrever o canal unitário do receptor P2Z ativado por ATP, que, após ser clonado, foi renomeado como receptor P2X7, tendo sido posteriormente caracterizado em inúmeras outras células do sistema imune. Apesar da importante descoberta para a área, a pergunta inicial do grupo não havia sido ainda completamente respondida, ou seja: como exatamente ATP induziria a formação de um poro na membrana de macrófagos? As correntes por eles registradas tinham condutâncias muito pequenas, em torno de 7 pS, não compatíveis com o que era esperado para poros não seletivos.

Na verdade, os resultados do grupo do professor Persechini até então alcançados indicavam que o possível poro induzido por ATP não funcionava como receptor-ligante; logo, sua abertura deveria ser dependente de segundos mensageiros. Nesse caso, as configurações da técnica *patch clamp* utilizadas para investigação do poro, *whole cell* e *outside-out*, não eram as mais favoráveis, uma vez que provocavam alterações no meio citoplasmático. Somente ao alterar a técnica de registro para a configuração *cell-attached*, que preserva o meio intracelular, foi possível registrar, em macrófagos, a atividade de canais ativados por ATP com grandes condutâncias. Demonstraram, portanto, pela primeira vez, o tão especulado poro responsável pelo fenômeno da permeabilização induzida por ATP e associada à expressão do receptor que, como já comentado, em momento posterior, foi clonado e nomeado como receptor P2X7 (Coutinho Silva; Persechini, 1997). Tratava-se de um ou dois poros com sensores de abertura voltados para a porção citoplasmática da célula e dependente de segundos mensageiros para sua abertura, como se comprovou mais tarde.

Em 1998, Robson Coutinho Silva é aprovado num concurso para o Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e se integra formalmente ao laboratório de Imunobiofísica chefiado pelo Professor Pedro Persechini. Juntos iniciam uma exploração voltada a entender as funções dos receptores purinérgicos nas células do sistema imune. Inicialmente, descreveram a presença de receptores P2X7 em células dendríticas (Coutinho Silva *et al.*, 1999) e fizeram uma extensiva

caracterização dos receptores P2X e P2Y expressos em macrófagos de camundongos e humanos (Coutinho Silva *et al.*, 2005). Adicionalmente, mostraram que a resposta da ativação de receptores P2X7 era reduzida durante a infecção por bactéria intracelular *Chlamydia* (Coutinho Silva *et al.*, 2001).

O grupo foi responsável pelas primeiras evidências do papel dos receptores P2X7 no contexto da resposta imune disparada pela infecção de bactéria intracelular *Chlamydia*, protozoários *T. cruzi* (Mantuano *et al.*, 2003) e *Leishmania* (Chaves *et al.*, 2009) ou mesmo vírus HIV (Schachter *et al.*, 2014; Schachter *et al.*, 2015), inaugurando, assim, uma nova linha de investigação, buscando entender o papel dos receptores purinérgicos no contexto da quebra da homeostase, quer seja durante a infecção por parasitas intracelulares, ou até mesmo durante doenças inflamatórias como obstrução unilateral dos rins (Goncalves *et al.*, 2006) ou doenças inflamatórias intestinais (Welter Stahl *et al.*, 2009). Nesse sentido, o professor Persechini desnudou a cascata intracelular ativada por ATP extracelular em macrófagos (Da Cruz *et al.*, 2006), vias envolvendo mediadores lipídicos (Da Silva Souza, H. A. *et al.*, 2014a; Da Silva Souza, H. A. *et al.*, 2014b), bem como demonstrou que a ativação do receptor P2X7 induz produção de ROS (Cruz *et al.*, 2007).

Uma característica marcante na vida acadêmica do professor Persechini foi ser sempre muito crítico ao volume de burocracia que envolve a pesquisa científica no Brasil. Dizia sempre que gostaria de aposentar-se para, de forma livre, entregar-se a fazer pesquisa sem cobranças de relatórios e formulários. Infelizmente, em paralelo com a sua aposentadoria, veio a doença que interrompeu sua trajetória de forma precoce, em junho de 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O professor Pedro Muanis Persechini tinha uma maneira democrática de chefiar seu laboratório, oferecendo toda a liberdade intelectual aos seus alunos. Foi capaz de formar várias lideranças científicas que atuam amplificando seu legado. Assim sendo, o trabalho pioneiro do prof. Persechini permitiu nuclear diferentes grupos de pesquisa espalhados pelo Brasil e exterior. Graças a ele, seus ex-alunos continuam contribuindo para formação de recursos humanos e

expansão do saber no nosso país. Como reconhecimento ao seu trabalho, o Clube Brasileiro de Purinas (CBP), em 2018, nomeou o Prêmio de Menção honrosa ofertado aos melhores trabalhos apresentados nos congressos organizados pelo CBP em "Menção honrosa Pedro Muanis Persechini".

BREVE BIOGRAFIA

Graduado em Física pela Universidade Federal de Minas Gerais (1973), Mestre em Física pela Universidade Federal de Minas Gerais (1976), Doutor em Ciências Biológicas – Biofísica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (1984) e Pós-Doutor pela "Rockefeller University"(1989), Pedro Muanis Persechini foi professor do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (1974-1976) e professor do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (1976-2018), onde criou seu laboratório de Imunobiofísica. Como Professor Titular, foi orientador no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biofísica da UFRJ, tendo orientado dezenas de teses e dissertações na área da sinalização purinérgica. Seus interesses situavam-se nas áreas da Imunologia, Biofísica e suas interseções. Mais recentemente, estava focado na caracterização biofísica, molecular e funcional de receptores de nucleotídeos (P2), canais iônicos e mecanismos de transporte presentes em células do sistema imune, e no estudo dos mecanismos de indução de morte celular empregados por linfócitos citotóxicos. Com o seu trabalho, visava conseguir desenvolver novas estratégias de imunomodulação que permitissem interferir em modelos experimentais de processos imuno-patológicos, aproximando a pesquisa básica da pesquisa clínica a partir de uma visão imunobiofísica.

REFERÊNCIAS

ADLER, R.; HATLEE, M. Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. Science v. 243, n. 4889, p. 391-393, 1989.

ALBUQUERQUE, C.; OLIVEIRA, S. M.; COUTINHO-SILVA, R.; OLIVEIRA-CASTRO, G. M.; PERSECHINI, P. M. ATP- and UTP-induced currents in macrophages and macrophage-polykaryons. American Journal of Physiology v. 265, p. C1663-C1673, 1993.

ALVES, L. A.; COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P. M.; SPRAY, D. C.; SAVINO, W.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C. Are there functional gap junctions or junctional hemichannels in macrophages? Blood v. 88, n. 1, p. 328-334, 1996.

CHAVES, S. P.; TORRES-SANTOS, E. C.; MARQUES, C.; FIGLIUOLO, V. R.; PERSECHINI, P. M.; COUTINHO-SILVA, R.; ROSSI-BERGMANN, B. Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by Leishmania amazonensis and its role in parasite elimination. Microbes.Infect. v. 11, p. 842-849, 2009.

COUTINHO-SILVA, R.; ALVES, L. A.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C.; SAVINO, W.; PERSECHINI, P. M. Characterization of P2Z purinergic receptors on phagocytic cells of the thymic reticulum in culture. Biochimica et Biophysica Acta v. 1280, p. 217-222, 1996a.

COUTINHO-SILVA, R.; ALVES, L. A.; SAVINO, W.; PERSECHINI, P. M. A cation non-selective channel induced by extracellular ATP in macrophages and phagocytic cells of thymic reticulum. Biochimica et Biophysica Acta v. 1278, p. 125-130, 1996b.

COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D. M.; GORECKI, D. C.; PERSECHINI, P. M.; BISAGGIO, R. C.; MENDES, A. N.; MARKS, J.; BURNSTOCK, G.; DUNN, P. M. Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. Biochemical Pharmacology v. 69, n. 4, p. 641-655, 2005.

COUTINHO-SILVA, R.; PERFETTINI, J.-L.; PERSECHINI, P. M.; DAUTRY-VARSAT, A.; OJCIUS, D. M. Modulation of P2Z/P2X7 receptor activity in macrophages infected with Chlamydia psittaci. American Journal of Physiology v. 280, p. C81-C89, 2001.

COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P. M. P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. American Journal of Physiology v. 273, p. C1793-C1800, 1997.

COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P. M.; BISAGGIO, R. C.; PERFETTINI, J.-L.; SÁ-NETO, A. C. T.; KANELLOPOULOS, J. M.; MOTTA-LY, I.; DAUTRY-VARSAT, A.; OJCIUS, D. M. P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. American Journal of Physiology v. 276, p. C1139-C1147, 1999.

CRUZ, C. M.; RINNA, A.; FORMAN, H. J.; VENTURA, A. L.; PERSECHINI, P. M.; OJCIUS, D. M. ATP activates a reactive oxygen species-

dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. J Biol.Chem. v. 282, n. 5, p. 2871-2879, 2007.

DA CRUZ, C. M.; VENTURA, A. L.; SCHACHTER, J.; COSTA-JUNIOR, H. M.; SILVA SOUZA, H. A.; GOMES, F. R.; COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D. M.; PERSECHINI, P. M. Activation of ERK1/2 by extracellular nucleotides in macrophages is mediated by multiple P2 receptors independently of P2X(7)-associated pore or channel formation. Br.J Pharmacol. v. 147, n. 3, p. 324-334, 2006.

DA SILVA-SOUZA, H. A.; DE LIRA, M. N.; PATEL, N. K.; SPRAY, D. C.; PERSECHINI, P. M.; SCEMES, E. Inhibitors of the 5-lipoxygenase pathway activate pannexin1 channels in macrophages via the thromboxane receptor. Am.J.Physiol Cell Physiol v. 307, n. 6, p. C571-C579, 2014a.

DA SILVA-SOUZA, H. A.; LIRA, M. N.; COSTA-JUNIOR, H. M.; DA CRUZ, C. M.; VASCONCELLOS, J. S.; MENDES, A. N.; PIMENTA-REIS, G.; ALVAREZ, C. L.; FACCIOLI, L. H.; SEREZANI, C. H.; SCHACHTER, J.; PERSECHINI, P. M. Inhibitors of the 5-lipoxygenase arachidonic acid pathway induce ATP release and ATP-dependent organic cation transport in macrophages. Biochimica et Biophysica Acta v. 1838, n. 7, p. 1967-1977, 2014b.

DE CARVALHO, R. P.; BRAAS, K. M.; ADLER, R.; SNYDER, S. H. Developmental regulation of adenosine A1 receptors, uptake sites and endogenous adenosine in the chick retina. Brain Res. Dev.Brain Res. v. 70, n. 1, p. 87-95, 1992.

DE MELLO, F. G. Dopamine-Dependent Modulation of CAMP Level in the Chick Retina.45. R. Levi-Montalcini. 1980. p. 343-359.

DE MELLO, M. C.; VENTURA, A. L.; PAES DE, C. R.; KLEIN, W. L. e DE MELLO, F. G. Regulation of dopamine- and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, v. 79, n. 18, p. 5708-5712, 1982.

DOS SANTOS-RODRIGUES, A.; FERREIRA, J. M.; PAES-DE-CARVALHO, R. Differential adenosine uptake in mixed neuronal/glial or purified glial cultures of avian retinal cells: modulation by adenosine metabolism and the ERK cascade. Biochemical and Biophysical Research Communications v. 414, n. 1, p. 175-180, 2011.

FERREIRA, J. M.; PAES-DE-CARVALHO, R. Long-term activation of adenosine A(2a) receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. Brain Research v. 900, n. 2, p. 169-176, 2001.

GONCALVES, R. G.; GABRICH, L.; ROSARIO, A., JR.; TAKIYA, C. M.; FERREIRA, M. L.; CHIARINI, L. B.; PERSECHINI, P. M.; COUTINHO-SILVA, R.; LEITE, M., JR. The role of purinergic P2X7 receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice. Kidney Int. v. 70, n. 9, p. 1599-1606, 2006.

JIANG, S.; PERSECHINI, P. M.; ZYCHLINSKY, A.; LIU, C.-C.; PERUSSIA, B.; YOUNG, J. D. E. Resistance of cytolytic lymphocytes to perforin-mediated killing: lack of correlation with complement-associated

homologous species restriction. Journal of Experimental Medicine v. 168, p. 2207-2219, 1988.

KWON, B. S.; WAKULCHIK, M.; LIU, C.-C.; PERSECHINI, P. M.; TRAPANI, J. A.; HAQ, A. K.; KIM, Y.; YOUNG, J. D. E. The structure of the mouse lymphocyte pore-forming protein perforin. Biochemical and Biophysical Research Communications v. 158, p. 1-10, 1989.

LANKFORD, K. L.; DEMELLO, F. G.; KLEIN, W. L. D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, v. 85, n. 12, p. 4567-4571, 1988.

MANTUANO, M. B.; HENRIQUES-PONS, A.; ARAUJO-JORGE, T. C.; DI VIRGILIO, F.; COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P. M. Extracellular ATP induces cell death in CD4+/CD8+ double-positive thymocytes in mice infected with Trypanosoma cruzi. Microbes Infect. v. 5, p. 1363-1371, 2003.

PAES-DE-CARVALHO, R.; Development of A1 adenosine receptors in the chick embryo retina. Journal of Neuroscience Research v. 25, n. 2, p. 236-242, 1990.

PAES-DE-CARVALHO, R.; BRAAS, K. M.; SNYDER, S. H.; ADLER, R. Analysis of adenosine immunoreactivity, uptake, and release in purified cultures of developing chick embryo retinal neurons and photoreceptors. Journal of Neurochemistry v. 55, n. 5, p. 1603-1611, 1990.

PAES DE, C. R.; DE MELLO, F. G. Adenosine-elicited accumulation of adenosine 3’, 5’-cyclic monophosphate in the chick embryo retina. Journal of Neurochemistry v. 38, n. 2, p. 493-500, 1982.

PAES-DE-CARVALHO, R.; DE MELLO, F. G. Expression of A1 adenosine receptors modulating dopamine-dependent cyclic AMP accumulation in the chick embryo retina. Journal of Neurochemistry v. 44, n. 3, p. 845-851, 1985.

PAES-DE-CARVALHO, R.; DIAS, B. V.; MARTINS, R. A.; PEREIRA, M. R.; PORTUGAL, C. C.; LANFREDI, C. Activation of glutamate receptors promotes a calcium-dependent and transporter-mediated release of purines in cultured avian retinal cells: possible involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Neurochemistry International v. 46, n. 6, p. 441-451, 2005.

PAES-DE-CARVALHO, R.; MAIA, G. A.; FERREIRA, J. M. Adenosine regulates the survival of avian retinal neurons and photoreceptors in culture. Neurochem.Res. v. 28, n. 10, p. 1583-1590, 2003.

PEREIRA, M. R.; HANG, V. R.; VARDIERO, E.; DE MELLO, F. G.; PAES-DE-CARVALHO, R. Modulation of A1 adenosine receptor expression by cell aggregation and long-term activation of A2a receptors in cultures of avian retinal cells: involvement of the cyclic AMP/ PKA pathway. Journal of Neurochemistry v. 113, n. 3, p. 661-673, 2010.

PERSECHINI, P. M.; ARAUJO, E. G.; OLIVEIRA-CASTRO, G. M. Electrophysiology of phagocytic

membranes: Induction of slow membrane hyperpolarizations in macrophages and macrophage polykaryons by intracellular calcium injection. Journal of Membrane Biology v. 61, p. 81-90, 1981.

PERSECHINI, P. M.; OLIVEIRA-CASTRO, G. M. Electrophysiology of phagocytic membranes: intracellular K+ activity and K+ equilibrium potential in macrophage polykaryons. Biochimica et Biophysica Acta v. 899, p. 213-221, 1987.

PERSECHINI, P. M.; YOUNG, J. D. E. The primary structure of the lymphocyte pore-forming protein Perforin: partial amino acid sequencing and determination of isoelectric point. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 156, p. 740-745, 1988.

SCHACHTER, J.; DELGADO, K. V.; BARRETO-DE-SOUZA, V.; BOU-HABIB, D. C.; PERSECHINI, P. M.; MEYER-FERNANDES, J. R. Inhibition of ecto-ATPase activities impairs HIV-1 infection of macrophages. Immunobiology v. 220, n. 5, p. 589-596, 2015.

SCHACHTER, J.; VALADAO, A. L.; AGUIAR, R. S.; BARRETO-DE-SOUZA, V.; ROSSI, A. D.; ARANTES, P. R.; VERLI, H.; QUINTANA, P. G.; HEISE, N.; TANURI, A.; BOU-HABIB, D. C.; PERSECHINI, P. M. 2 ,3 -Dialdehyde of ATP, ADP, and adenosine inhibit HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication. Curr. HIV. Res., v. 12, n. 5, p. 347-358, 2014.

SOCODATO, R.; BRITO, R.; CALAZA, K. C.; PAES-DE-CARVALHO, R. Developmental regulation of neuronal survival by adenosine in the in vitro and in vivo avian retina depends on a shift of signaling pathways leading to CREB phosphorylation or dephosphorylation. Journal of Neurochemistry, v. 116, n. 2, p. 227-239, 2011.

WELTER-STAHL, L.; DA SILVA, C. M.; SCHACHTER, J.; PERSECHINI, P. M.; SOUZA, H. S.; OJCIUS, D. M.; COUTINHO-SILVA, R. Expression of purinergic receptors and modulation of P2X(7) function by the inflammatory cytokine IFNgamma in human epithelial cells. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1788, n. 5, p. 1176-1187, 2009.

YOUNG, J. D. E.; LIU, C.-C.; PERSECHINI, P. M. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated killing. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 21, p. 1145-1153, 1988.

EXERCÍCIO FÍSICO E SISTEMA PURINÉRGICO

Hugo Falqueto
Jorge Lúcio Rodrigues Júnior
Andréia Machado Cardoso
Leandro Henrique Manfredi

INTRODUÇÃO

O exercício físico representa um grande desafio para a homeostase do corpo e provoca estresse em células, tecidos e órgãos, sendo uma resposta ao aumento da atividade metabólica da contração dos músculos esqueléticos para realizar movimentos (Hawley *et al.*, 2014). A atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que resulta em gasto energético. Já o exercício físico é uma atividade física planejada e estruturada cujo objetivo é a manutenção ou melhora de uma aptidão física e/ou induzir adaptações na capacidade cardiorrespiratória, força muscular, flexibilidade e agilidade. Na literatura é comum reportar a denominação exercício físico, uma vez que os indivíduos dos estudos são submetidos a um protocolo sistematizado. No entanto, o termo atividade física também é mencionado, como em estudos transversais que analisam o comportamento da prática de atividade física (Caspersen; Powell; Christenson, 1985).

Os exercícios também são classificados em diferentes tipos, de acordo com os objetivos, como exercício aeróbico e exercício contra resistência, comumente utilizados para melhorar a capacidade cardiovascular e força muscular, respectivamente (Pescatello *et al.*, 2014). Além de o exercício físico promover melhoras nas capacidades requeridas em diversas modalidades esportivas, também propicia

adaptações com potencial de melhorar aspectos da qualidade de vida, prevenir a ocorrência de problemas de saúde e também ser utilizada como um meio de medida terapêutica (Booth; Roberts; Laye, 2012).

Berne (1964) foi um dos primeiros a descrever que o sistema purinérgico poderia estar envolvido em adaptações induzidas pelo exercício físico, como na regulação do fluxo sanguíneo. A adenosina trifosfato (ATP) foi considerada, por muito tempo, uma molécula intracelular que estava envolvida apenas com o metabolismo de energia celular. No entanto, nas últimas décadas, este nucleotídeo tem sido considerado um mensageiro extracelular para a sinalização autócrina e parácrina (Casas; Buvinic; Jaimovich, 2014). Purinas e pirimidinas desempenham papéis importantes na regulação de várias funções corporais relacionadas ao exercício físico e podem explicar adaptações agudas e crônicas. Dentre os efeitos agudos, aqueles que ocorrem durante ou imediatamente após o exercício físico, a adenosina e o ATP podem estar relacionadas com a regulação do fluxo sanguíneo (Mortensen; Saltin, 2014). Apesar da escassez de informações na literatura sobre as adaptações crônicas, ou seja, as adaptações que ocorrem ao longo de dias ou semanas, relacionadas ao sistema purinérgico e ao exercício físico, há a possibilidade de adaptações que reduzam a agregação plaquetária e, consequentemente, reduzam o risco de doenças cardiovasculares (Cardoso *et al.*, 2012).

As purinas são liberadas de diferentes tipos de células e em diferentes condições ou podem ser geradas por ectonucleotidases expressas na superfície celular (Burnstock, 2017). Durante o exercício, ocorre um estresse em diferentes tipos de células, como miócitos, eritrócitos, linfócitos, plaquetas, células endoteliais e, dessa forma, o sistema purinérgico pode ter papel importante na modulação dessas respostas.

Adaptações cardiovasculares no exercício

Por muitos anos, não havia um consenso de como ocorria a vasodilatação durante o exercício físico, uma vez que há um aumento da atividade neural simpática, a qual é responsável pela vasoconstrição periférica e, consequentemente, induz o aumento da pressão arterial (PA), principalmente da PA sistólica (Buckwalter; Clifford, 2001). Dessa forma, parecia fundamental entender quais eram os mediadores que promoviam a vasodilatação durante o exercício físico apesar

do aumento da atividade simpática. De maneira interessante, a literatura nas últimas décadas constatou que o sistema purinérgico talvez possa estar envolvido nesses processos e explique o aumento da atividade simpática e da vasodilatação durante o exercício físico (Biaggioni, 2007).

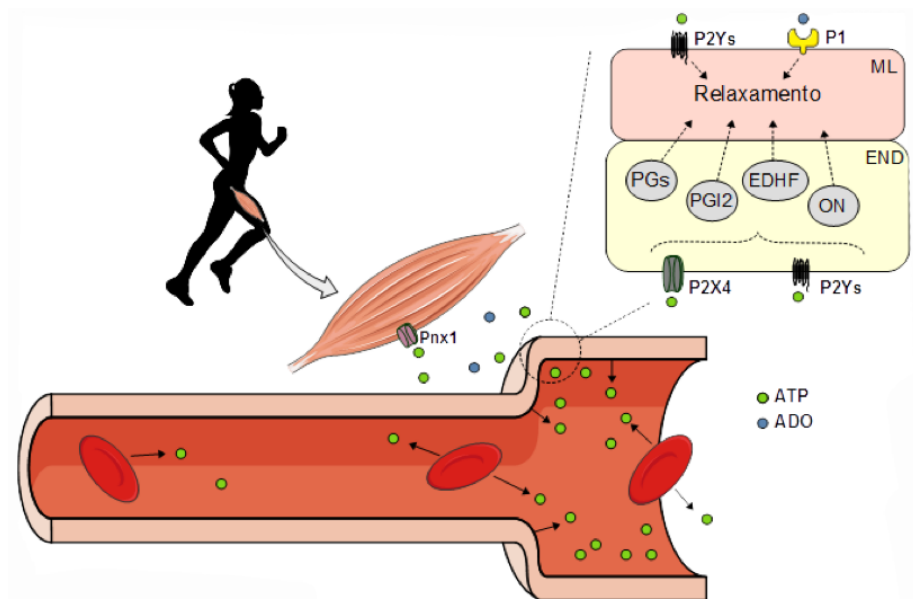
Primeiramente, foi constatado que os receptores purinérgicos P2X2/3, localizados nos neurônios aferentes dos músculos esqueléticos, podem enviar sinais ao centro cardiovascular do bulbo e proporcionar um aumento da atividade simpática, desencadeando um aumento da frequência cardíaca, da PA e uma vasoconstrição periférica. Esse fenômeno – Reflexo Pressor do Exercício – é deflagrado por metabólitos, como o ATP, liberados pelo músculo durante o exercício físico (Mccord; Tsuchimochi; Kaufman, 2010). No entanto, apesar desse mecanismo explicar uma vasoconstrição sistêmica, parece que, localmente, em regiões que estão sendo estimuladas, como no músculo esquelético, o sistema purinérgico participa da vasodilatação (Mortensen; Saltin, 2014). Isso é uma adaptação aguda relevante na prática do exercício, visto a necessidade de redistribuição do fluxo sanguíneo para locais com maior demanda energética, como músculos em contrações, em prol de territórios com menores demandas, como o sistema gastrointestinal. É necessário, portanto, explicar os mecanismos que promovem a vasodilatação local promovida pelo sistema purinérgico.

Durante o exercício ocorre a liberação de nucleotídeos em diversos tecidos. O ATP pode ser liberado dos nervos pós-ganglionares simpáticos junto com a noradrenalina, mas não é certo que eles podem contribuir para o aumento da concentração de ATP no plasma. O próprio músculo esquelético também tem sido proposto como uma fonte potencial de ATP no plasma durante as contrações musculares. No entanto, os eritrócitos e as células endoteliais vasculares são considerados principais fontes do nucleotídeo e, consequentemente, os maiores responsáveis pela vasodilatação durante o exercício (Crecelius; Kirby; Dinenno, 2015).

As contrações musculares repetidas durante o exercício físico provocam aumento do metabolismo, o que resulta em maior consumo de oxigênio, produção de CO2 e acidose e também podem estimular a liberação de ATP pelas hemácias. Além disso, o estresse mecânico causado pela contração muscular eleva a pressão extravascular causando compressão ou distorção dos vasos sanguíneos, expondo os eritrócitos a um estresse ainda maior durante o exercício físico, o que aumenta a liberação de ATP (Crecelius; Kirby; Dinenno, 2015). Ademais, os eritrócitos são sensíveis à pressão parcial de oxigênio (PpO2) sanguíneo e regulam uma

resposta adequada sobre diferentes condições de pressão (Sprague *et al.*, 2011). Durante a realização de um exercício físico, há aumento da demanda de oxigênio para processos metabólicos intracelulares de produção de energia; portanto, a PpO2 reduz em uma região muscular ativa e, como consequência, os glóbulos vermelhos se deformam e liberam ATP (Jäger *et al.*, 2014; Sprague *et al.*, 2011).

No plasma, o ATP, assim como a adenosina (abordada no tópico 2.4 Adenosina: papel e funções no exercício), é um potente vasodilatador. Quando o ATP se liga aos receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4 e P2X4, presentes no endotélio, estimula a formação de óxido nítrico (ON), prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI2) e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF). Esses mediadores promovem um relaxamento dos músculos lisos e da vasodilatação, sendo responsáveis por contrapor a vasoconstrição simpática (Figura 1). Além disso, o ATP e a adenosina presentes no espaço intersticial podem atuar diretamente nos receptores P2Ys (P2Y1, P2Y2, P2Y4) e P1 (A1, A2A e A2B), respectivamente, presentes no músculo liso e proporcionarem seu relaxamento (Burnstock, 2017; Mortensen; Saltin, 2014). Essa capacidade de limitar a vasoconstrição simpática, conhecida como simpatólise funcional, é um evento significativo que ocorre em músculos em atividade e permite o aumento do fluxo sanguíneo para regiões em movimento, apesar da elevação da atividade simpática (Saltin; Mortensen, 2012). Mortensen *et al.* (2012b) constataram que idosos sedentários possuem uma menor simpatólise funcional na perna em comparação aos jovens, mas essa redução funcional relacionada à idade é menos evidente em idosos fisicamente ativos. No estudo, os idosos fisicamente ativos apresentaram maior concentração de ATP intersticial após o exercício quando comparado aos sedentários, podendo sugerir um maior potencial em sinalizar para os receptores endoteliais vasculares e musculares lisos para proporcionar a vasodilatação. Portanto, segundo os autores, a atividade física pode prevenir o comprometimento no fluxo sanguíneo relacionado à idade e manter um fornecimento de O2 e nutrientes (aminoácidos, glicose, etc.) durante o exercício físico, apesar da perda da função endotelial, comum em idosos.

Figura 1: Participação do sistema purinérgico na vasodilatação induzida pelo exercício físico

Fonte: elaboração própria.

* Nas células endotelias (END) quando o ATP se liga aos receptores P2Ys (P2Y1, P2Y2. P2Y4) e P2X4, induzem a formação de óxido nítrico (ON), prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI2) e fatores hiperpolarizante derivados do endotelio (EDHF) que induzem o relaxamento dos músculos lisos (ML). Além disso, o ATP e a Adenosina (ADO), localizados no interstício e liberados de células do músculo esquelético em atividade, se ligam aos receptores P2Ys (P2Y1, P2Y2. P2Y4) e P1 (A1, A2A e A2B) e também induzem o relaxamento dos músculos lisos. Pontos em verde: ATP; pontos em azul: Adenosina (ADO).

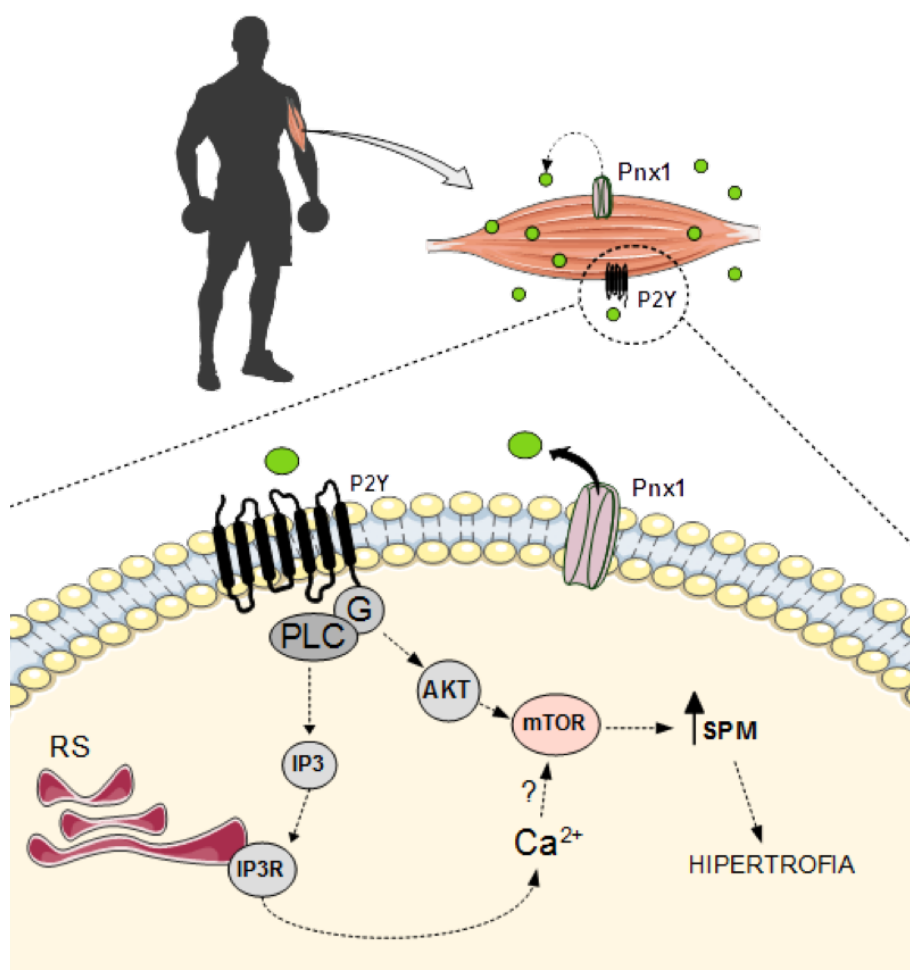
Em termos de desempenho, o aumento do fluxo sanguíneo durante o exercício promove uma maior disponibilidade de nutrientes e oxigênio para a musculatura em atividade, capacidade de recuperação mais rápida entre os estímulos físicos, manutenção do desempenho por mais tempo e reparação de danos musculares de forma mais eficiente entre as sessões de treinamento (Jäger *et al.*, 2014).

Adaptações do tecido muscular no exercício

Diversos receptores purinérgicos, como P2X1, P2X4, P2X5, P2Y1, P2Y2, P2Y3, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y13 e P2Y14, estão presentes nas fibras musculares e podem desempenhar distintas funções por meio de sinais mediados por ATP e ADP (Bornø *et al.*, 2012; Casas; Buvinic; Jaimovich, 2014; Fernández-Verdejo *et al.*, 2013). Em humanos, já foi verificada a presença dos receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 e P2X1 na célula muscular diferenciada (Bornø *et al.*, 2012; May *et al.*, 2006). Assim, apesar de haver diferenças na expressão dos receptores entre espécies, as vias de sinalizações intracelulares que explicam as adaptações musculares no exercício, como hipertrofia, captação de glicose, contração e liberação de miocinas, podem ser induzidas pelos receptores purinérgicos e proporcionar implicações significativas para a prática do exercício físico e para a saúde.

A hipertrofia muscular, que ocorre principalmente após exercício físico contra resistência, é uma consequência de sucessivos estímulos agudos que desencadeiam o aumento da síntese proteica intracelular e em longo prazo um aumento da área de seção transversa do músculo (Mcglory; Devries; Phillips, 2017). Ao realizar a contração muscular em um exercício físico, ocorre a liberação de ATP dos músculos pelos hemicanais da panexina 1 (Pnx1) (Bustamante *et al.*, 2014). Além disso, os nucleotídeos extracelulares podem ser liberados de diferentes células em torno do músculo, como neurônio motor, células endoteliais e ósseas, que podem atuar diretamente em células musculares (Burnstock; Arnett; Orriss, 2013). Jiménez *et al.* (2018) mostraram que o ATP extracelular promove o aumento da síntese proteica no músculo esquelético de roedores por meio da ativação de receptores P2Ys e da via de sinalização Akt-mTOR. Apesar de não especificado pelos autores, acredita-se que o receptor P2Y2, um dos mais abundantes no músculo de roedores, seja o principal responsável pela sinalização. Em outro estudo, in vitro, a ativação do receptor P2Y2 pelo ATP induz a produção de inositol trifosfato (IP_3) por meio da ativação de fosfolipase C (PLC), causando liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) mediado pelo receptor de inositol trifosfato (IP3R). Esse aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular é responsável pela ativação de mTOR, uma proteína chave na síntese proteica. Os autores constataram também que a administração diária de ATP por via intramuscular em roedores, durante 1 semana, levou à hipertrofia de uma maneira

dependente de mTOR e Ca^{2+} (ITO *et al.*, 2018). Ainda não está claro como o Ca^{2+} ativa mTOR, mas sugere-se que o Ca^{2+} promova uma interação com a calmodulina (CaM) e o complexo Ca^{2+}/CaM formado se ligue a proteína hVps34 que é necessária para a atividade da lipase quinase e, consequentemente, aumento da sinalização de mTOR (Gulati *et al.*, 2008).

Figura 2: Exercício físico contra resistência: um estímulo ideal para sinalização purinérgica na indução da hipertrofia

Fonte: autores (2019).

* Por aplicar altas tensões musculares durante a contração muscular, o exercício físico contra resistência, pode ser um estímulo ideal para sianlização purinérgica a indução da hipertrofia. O ATP (pontos em verde) liberado pelos hemicanais da panexina 1 (Pnx1) se liga aos receptores P2Ys, que estão acoplados à proteína G, e induz sinalizações intracelulares para o aumento da síntese proteica e promoção da hipertrofia. Inositol trifosfato (IP3); fosfolipase C (PLC); retículo sarcoplasmático (RS); receptor de inositol trifosfato (IP3R); alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR); síntese de proteína muscular (SPM); pontos em verde: ATP.

Os mecanismos responsáveis pela hipertrofia muscular durante o exercício físico, principalmente o exercício contra resistência, ainda não estão completamente elucidados (Wackerhage *et al.*, 2019). Entretanto, as evidências anteriores sugerem um possível papel do sistema purinérgico nesse processo, uma vez que o ATP liberado da fibra muscular em contração e/ou de outras células adjacentes, como neurônio motor, pode desencadear sinalizações intracelulares por meio dos receptores P2Ys e promover o aumento da síntese proteica e, consequentemente, hipertrofia (Figura 2). Além disso, a concentração de ATP intersticial, que foi liberado do meio intracelular, apresenta uma relação direta com a tensão aplicada no músculo durante a contração (Li; King; Sinoway, 2003). Sendo assim, as altas tensões musculares proporcionadas pelo exercício físico contra resistência podem ser um estímulo ideal para a sinalização purinérgica.

Ainda em relação ao receptor P2Y2, foi mostrado que o exercício físico de extensão de perna realizado durante 5 semanas aumentou sua expressão no vasto lateral de homens jovens (Mortensen *et al.*, 2012a). Além disso, idosos fisicamente ativos apresentam maior número do receptor no músculo em relação aos sedentários e acumulam maior quantidade de ATP no interstício muscular com a prática de exercício (Mortensen *et al.*, 2012b). Esses resultados sugerem um maior potencial anabólico, uma vez que um músculo com maior expressão de P2Y2 pode ser mais sensível ao ATP extracelular e induzir maior nível de sinalização intracelular para síntese proteica. Esse papel do sistema purinérgico na indução da síntese proteica e, consequentemente, hipertrofia muscular é fundamental para atenuar quadros de resistência anabólica muscular em idosos, sarcopenia e caquexia.

Durante o exercício físico, a captação de glicose pelas células musculares é aumentada devido à demanda energética imposta, podendo ser independente da insulina (Stanford; Goodyear, 2014). Presume-se ainda que o ATP e os receptores purinérgicos podem estar envolvidos na captação de glicose atuando na translocação dos transportadores de glicose. Em um estudo, o ATP estimulou o transporte de glicose por meio da ativação de receptores purinérgicos em cultura de células musculares esqueléticas C2C12, o que facilitou a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (Suk Kim *et al.*, 2002). Osorio-Fuentealba *et al.* (2012) verificaram que os receptores P2Ys e a via PI3Kγ-Akt-AS160 estão envolvidas neste processo, no entanto, ainda são desconhecidos os receptores específicos que atuam na translocação do GLUT4. A captação de glicose é fundamental para posterior glicólise e produção de ATP intramuscular durante o exercício físico e importante no controle glicêmico, principalmente em pacientes com diabetes mellitus (DM) (Codella *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, foi verificado que o ATP extracelular é um mediador relevante na despolarização da membrana e do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} (Casas; Buvinic; Jaimovich, 2014). Buchthal e Folkow (1944) inicialmente constataram que a injeção de ATP na artéria isquiática, que supre o músculo gastrocnêmio da rã, induziu leves contrações musculares. O ATP pode aumentar a excitabilidade do músculo esquelético, tornando-o mais sensível a ação da acetilcolina (ACh) (May *et al.*, 2006). A sinalização via receptores P2Y1 aumenta a atividade da bomba de Na+/K+ e pode participar desse aumento da excitabilidade muscular a fim de promover a contração muscular (Broch-Lips; Pedersen; Nielsen, 2010).

Sandonà *et al.* (2005) demonstraram que a sinalização de ATP extracelular no receptor P2X4 aumenta o influxo de Ca2+ no músculo esquelético e a liberação do íon do RS, favorecendo as propriedades contráteis do músculo. In vitro, o aumento do influxo de Ca2+ no músculo esquelético e das concentrações intracelulares mostrou elevar significativamente tanto o número de pontes cruzadas entre filamentos contráteis quanto a velocidade na qual os filamentos deslizam (Homsher *et al.*, 1996). Esses achados fornecem provas do papel da sinalização purinérgica em promover melhoras na contração muscular, favorecendo a capacidade de produzir força muscular e potência muscular no esporte e reduzir a perda dessas capacidades advinda com a idade.

Ainda é incerto se o ATP liberada pelo tecido muscular em condições de exercício pode atuar em outros tecidos, pois a meia-vida das moléculas de purinas não passam de poucos segundos e são rapidamente metabolizados por diversas enzimas presentes em células sanguíneas (Burnstock; Arnett; Orriss, 2013; Casas; Buvinic; Jaimovich, 2014). Portanto, é improvável que as purinas liberadas no interstício muscular alcancem os vasos sanguíneos e promovam efeitos em outros tecidos. No entanto, a expressão e liberação de IL-6, uma miocina de ação sistêmica, em células musculares esqueléticas é estimulada por receptores P2Ys, que explicam o aumento da IL-6 plasmática em até 10 vezes durante o exercício (Bustamante *et al.*, 2014; Fernández-Verdejo *et al.*, 2013).

A despolarização da membrana do músculo esquelético responsável pela contração muscular, que ocorre durante o exercício físico, induz a liberação de ATP através dos canais Pnx1. Após a ligação aos receptores purinérgicos P2Ys, principalmente P2Y1, P2Y2 e P2Y14, de forma parácrina e autócrina, a ATP provoca um aumento na concentração intracelular de Ca2+, ativando a cascata de sinalização Gβγ-PI3K-PLC que, por consequência, induz a expressão da IL-6. A IL-6 formada e liberada da fibra muscular alcança os vasos sanguíneos para desempenhar diversas funções (Bustamante *et al.*, 2014; Fernández-Verdejo *et al.*, 2013).

A IL-6 está envolvida durante o exercício na captação de glicose, na oxidação de ácido graxos do tecido muscular, na lipólise de tecido adiposo e na produção aumentada de glicose hepática (Pedersen *et al.*, 2016; Whitham; Febbraio, 2016). Apesar de IL-6 ser uma citocina pró-inflamatória, quando liberada do tecido muscular, desempenha uma função anti-inflamatória, reduzindo os níveis de TNF-α enquanto aumenta os de IL-10 e IL-1RA, devido a sua atuação em monócitos e macrófagos (Pedersen, 2013). Esse papel anti-inflamatório confere proteção contra desordens cardiovasculares, câncer e diversas outras condições que apresentem a inflamação sistêmica crônica de baixo grau em sua etiologia (Fiuza-Luces *et al.*, 2018; Gleeson *et al.*, 2011). Ademais, ações momentâneas agudas da IL-6 estão envolvidas em processos de hipertrofia muscular e ativação/mobilização de células satélites (Belizário *et al.*, 2016). Ratos *knouckout* para o gene IL-6 não respondem a hipertrofia induzida por sobrecarga (Serrano *et al.*, 2008) e, portanto, além de atuar diretamente na hipertrofia muscular, como relatado anteriormente, o sistema purinérgico por meio da IL-6 também desempenha

um papel no ganho de massa muscular mediado por exercício físico, principalmente exercício contra resistência.

Pedersen *et al.* (2016) verificaram que a IL-6 está envolvida na redistribuição de células natural *killers* (NK). Nesse estudo, roedores submetidos a corrida voluntária produziram a citocina e apresentaram maior infiltração de NK em tumores, reduzindo em até 60% a incidência e o crescimento tumoral. Recentemente, foi demonstrado que a perda do tecido adiposo visceral é dependente da IL-6. Após 12 semanas de exercício físico, o grupo que teve o receptor de IL-6 bloqueado por um anticorpo não reduziu a massa adiposa visceral (Wedell-Neergaard *et al.*, 2018). Portanto, a modulação da expressão da IL-6 pelo sistema purinérgico parece ser crítica para as adaptações agudas e crônicas que ocorrem com o exercício físico.

Enzimas do sistema purinérgico no exercício físico

As enzimas do sistema purinérgico são compostas principalmente por E-NTPDases (isoformas 1, 2, 3, 5, 6 e 8), ecto-5'-nucleotidase (CD73) e adenosina desaminase (ADA). As E-NTPDases e CD73 são duas ectoenzimas da superfície celular que desfosforilam o ATP nos seus metabólitos, ADP, AMP e adenosina, em um processo rigorosamente regulado. A conversão de ATP em AMP é catalisada por E-NTPDases, enquanto CD73 catalisa desfosforilação de AMP em adenosina. A ADA catalisa a conversão de adenosina em inosina (Burnstock, 2017; Yegutkin, 2008). A enzima CD39, uma E-NTPDase, é expressa em células como músculo liso, linfócitos e endoteliais vasculares; CD37 está presente em tecido do rim, cérebro, pulmão, fígado, coração, linfócitos e no endotélio vascular; ADA é expressa em linfócitos, células dendríticas e no coração (Burnstock, 2017; Yegutkin, 2008). Além disso, foi constatado que o músculo esquelético pode induzir uma hidrólise atípica do ATP, sem mediação de enzimas, por meio do α-sarcoglicano, um membro de um subcomplexo dentro do complexo de proteínas associadas à distrofina (Sandonà *et al.*, 2004). Essas enzimas e mediadores influenciam diretamente a proporção da concentração de nucleotídeos e como eles atuarão em seus respectivos receptores, podendo, portanto, apresentar implicações durante o exercício físico.

Roque *et al.* (2011) verificaram que, após 10 semanas de exercício aeróbico moderado, a atividade da CD39 e da CD73 aumentou no soro sanguíneo e no miocárdio de ratos. Segundo os autores, a atividade aumentada dessas enzimas nesses locais é responsável pela hidrólise extracelular de nucleotídeos, podendo aumentar a produção de adenosina, a qual contribui para o aumento do fluxo sanguíneo coronariano e angiogênese em ratos treinados (Roque *et al.*, 2011). No entanto, em outro estudo, ratos submetidos a 20 minutos de exercício aeróbico moderado por duas semanas apresentaram redução da hidrólise de ATP e ADP em sinaptossomas hipocampais e soro sanguíneo, sugerindo menor atividade de E-NTPDases, como a CD39 (Siqueira *et al.*, 2010). No mesmo estudo, 12 semanas de exercício aeróbico moderado de 20 minutos, três vezes por semana, não alteraram a hidrólise de nucleotídeos de adenina em sinaptossomas hipocampais, mas aumentaram a hidrólise de ATP no soro sanguíneo (Siqueira *et al.*, 2010). Assim, a atividade de E-NTPDases pode responder de forma distinta para diferentes protocolos de exercício e tipos celulares.

Em um estudo conduzido em ratos hipertensos, uma única sessão de exercício moderado aeróbico aumentou a hidrólise de ATP, ADP e AMP em plaquetas, sugerindo uma maior atividade de CD39 (Cardoso *et al.*, 2012). No entanto, cronicamente, o exercício aeróbico moderado de uma hora, cinco vezes por semana, reduziu a hidrólise dos nucleotídeos nas plaquetas, sugerindo menor atividade da CD39 em relação aos sedentários (Cardoso *et al.*, 2012). Sendo assim, os ratos hipertensos retiveram maiores níveis de hidrólise de nucleotídeos nas plaquetas podendo ser uma medida profilática para evitar complicações advindas da hipertensão, como a agregação plaquetária (Cardoso *et al.*, 2012). Em relação à ADA, Rutkiewicz e Górski (1992) foram os primeiros a mostrar que a atividade da enzima diminui nas células musculares no início de um exercício moderado, contribuindo, assim, para a vasodilatação. Depois, Laxson; Homans e Bache (1993) administraram ADA exógena em ratos durante o exercício e mostraram que a isquemia miocárdica foi exacerbada, comprovando a importância da atividade da ADA na regulação da vasodilatação coronária mediada por aumento da adenosina. Entretanto, no exercício aeróbico agudo, a maioria dos estudos mostrou um aumento da atividade da ADA em locais como no plasma (Bassini-Cameron *et al.*, 2007; Belviranli *et al.*, 2012) e no coração (Langfort *et*

al., 1996). Além disso, cronicamente, a maioria dos trabalhos não observou alterações na atividade da ADA (Belviranli *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2012, 2015; Newsholme *et al.*, 1985).

Recentemente, em atletas semiprofissionais de futsal, o exercício intermitente de alta intensidade (HIIT) por 40 minutos induziu uma diminuição na hidrólise de ATP e ADP nas plaquetas, um aumento na hidrólise da adenosina e um aumento na agregação plaquetária imediatamente após o exercício (Miron *et al.*, 2018). No entanto, após 30 minutos do fim do exercício, a atividade enzimática e a agregação plaquetária retornaram aos níveis basais (Miron *et al.*, 2018). Dessa forma, o HIIT agudo desencadeia um status pró-agregante transitório que é revertido após 30 minutos de recuperação. Nos linfócitos, a hidrólise da adenosina (atividade da ADA) foi aumentada imediatamente após o exercício e permaneceu elevada mesmo após 30 min de recuperação sem uma alteração significativa na atividade de CD39 (Miron *et al.*, 2018). Uma vez que a adenosina apresenta uma ação imunossupressora e anti-inflamatória, atuando em células como neutrófilos, macrófagos e linfócitos por meio de receptores A2A e A2B (Haskó; Cronstein, 2013), uma hidrólise aumentada desse nucleotídeo em células imunológicas, como linfócitos, pode sugerir um potencial inflamatório acentuado durante e após o exercício. Além disso, o quadro de linfocitose, que ocorre imediatamente após esse tipo de exercício, contribui ainda mais para a ação linfocitária (Nieman *et al.*, 1994). Esse estado inflamatório agudo é importante na mobilização e atuação do sistema imune a fim de equilibrar as demandas energéticas e reparar os danos teciduais advindos do exercício físico (Gleeson, 2007; Peake *et al.*, 2017).

Adenosina: papel e funções no exercício

Durante uma sessão aguda de exercício, a adenosina tem um importante papel vasodilatador por meio do relaxamento da musculatura lisa vascular (Ballard, 2014). Esse papel da adenosina é dependente da duração e intensidade do exercício. A adenosina não contribuiu para a resposta vasodilatadora em contrações que duraram menos de um minuto e quando a intensidade do exercício foi menor que a moderada (Klabunde, 1986; Schwartz; Mckenzie, 1990), mas é responsável por 20% a 40% da hiperemia mantida em exercício com cargas submáximas e máximas (Marshall, 2007). Em humanos, a concentração de adenosina no plasma

parece não aumentar durante o exercício, o que provavelmente está relacionado a uma rápida meia-vida (Hellsten; Nyberg, 2015). No entanto, no interstício muscular, a concentração de adenosina aumenta com exercício (Hellsten *et al.*, 1998), sugerindo uma contribuição local para a hiperemia (Figura 1), uma vez que a infusão intravascular de adenosina mostrou um papel mínimo na resposta hiperêmica em humanos (Sushant *et al.*, 2016).

Apesar de provocar efeitos potenciais vasodilatadores durante o exercício, a adenosina pode ter efeitos prejudiciais tanto para a saúde quanto para o desempenho esportivo, dependendo do local de ação. Verificou-se que o exercício aeróbico moderado foi capaz de prevenir o aumento na expressão de receptores A2A, das enzimas CD39 e CD73 no córtex e no hipocampo de ratos hipertensos, sugerindo uma menor hidrólise de ATP e produção de adenosina (Cardoso *et al.*, 2018). Além disso, os autores constataram que esses efeitos são responsáveis por prevenir a perda de memória nos ratos hipertensos, uma vez que a ligação da adenosina ao receptor A2A faz parte da etiologia de algumas disfunções cerebrais responsáveis pela perda de memória (Cardoso *et al.*, 2018).

Por fim, o exercício físico extenuante ou uma recuperação inadequada durante sessões de treino levam ao quadro de fadiga mental e comprometem a performance esportiva. O acúmulo de adenosina no sistema nervoso central, principalmente no córtex cingulado anterior, pode ser o principal responsável por essa exaustão, uma vez que inibe vias dopaminérgicas trazendo como consequências um aumento da percepção de esforço e redução no desempenho físico e cognitivo (Martin *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2018). O papel antagonista de adenosina explica o efeito ergogênico comprovado da cafeína e seu uso no meio esportivo (Grgic *et al.*, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo do capítulo, foram evidenciadas várias adaptações agudas, como regulação do fluxo sanguíneo e captação de glicose, e adaptações crônicas, como hipertrofia muscular e aumento da expressão de receptores musculares. Além disso, muitas adaptações do sistema purinérgico podem divergir entre agudas e

crônicas, como atividade da CD39 em plaquetas que aumenta de forma aguda, entretanto, reduz cronicamente.

Ainda é necessário destacar que muitas adaptações crônicas advindas do exercício surgem após sucessivos estímulos agudos com participação pontual e momentânea do sistema purinérgico. Um exemplo é a captação de glicose no músculo, mediado pelo ATP e os receptores P2Ys. Essa é uma adaptação aguda, porém, em longo prazo, sucessivos estímulos de captação de glicose podem proporcionar o controle glicêmico, sem, no entanto, ocorrer qualquer adaptação crônica no que diz respeito ao sistema purinérgico.

Espera-se que novas evidências possam elucidar ainda mais o papel do sistema purinérgico no exercício, com uma especificação mais precisa dos receptores, uma vez que podem desencadear ações antagônicas e diferentes expressões entre espécies. O mesmo pode ocorrer com as enzimas, que podem variar sua expressão entre espécies e entre tipos celulares.

Além disso, aspectos nutricionais e farmacológicos podem influenciar diretamente o sistema purinérgico e causar impactos significativos no campo esportivo, necessitando, portanto, maior esclarecimento sobre os mecanismos de ação. Um exemplo está no papel ergogênico esportivo da suplementação de ATP.

Por fim, é incontestável o papel das purinas nas adaptações do exercício físico, no entanto, estudos futuros devem ampliar e detalhar seus mecanismos de ação, uma vez que o exercício físico se apresenta como uma medida profilática e terapêutica para diversos quadros clínicos.

REFERÊNCIAS

BALLARD, H. J. ATP and adenosine in the regulation of skeletal muscle blood flow during exercise. Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica], v. 66, n. 1, p. 67-78, fev. 2014.

BASSINI-CAMERON, A. *et al.* Effect of caffeine supplementation on haematological and biochemical variables in elite soccer players under physical stress conditions. British Journal of Sports Medicine, v. 41, n. 8, p. 523-530, mar. 2007.

BELIZÁRIO, J. E. *et al.* Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6. SpringerPlus, v. 5, n. 1, p. 619, dez. 2016.

BELVIRANLI, M. *et al.* Effects of grape seed extract supplementation on exercise-induced oxidative stress in rats. British Journal of Nutrition, v. 108, n. 02, p. 249-256, jul. 2012.

BERNE, R. M. Regulation of coronary blood flow. Physiological reviews, v. 44, n. 1, p. 1-29, jan. 1964.

BIAGGIONI, I. Autonomic/metabolic interactions modulating the exercise pressor reflex: the purinergic hypothesis. The Journal of physiology, v. 578, n. 1, p. 5-6, jan. 2007.

BOOTH, F. W.; ROBERTS, C. K.; LAYE, M. J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. Comprehensive Physiology, v. 2, n. 2, p. 1143-1211, 2012.

BORNØ, A. *et al.* Purinergic receptors expressed in human skeletal muscle fibres. Purinergic signalling, v. 8, n. 2, p. 255-64, jun. 2012.

BROCH-LIPS, M.; PEDERSEN, T. H.; NIELSEN, O. B. Effect of purinergic receptor activation on Na + -K + pump activity, excitability, and function in depolarized skeletal muscle. American Journal of Physiology-Cell Physiology, v. 298, n. 6, p. C1438-C1444, jun. 2010.

BUCHTHAL, F.; FOLKOW, B. Close Arterial Injection of Adenosine Triphosphate and Inorganic Triphosphate into Frog Muscle. Acta Physiologica Scandinavica, v. 8, n. 4, p. 312-316, dez. 1944.

BUCKWALTER, J. B.; CLIFFORD, P. S. The paradox of sympathetic vasoconstriction in exercising skeletal muscle. Exercise and Sport Sciences Reviews, v. 29, n. 4, p. 159-163, 2001.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. Circulation Research, v. 120, n. 1, p. 207-228, jan. 2017.

BURNSTOCK, G.; ARNETT, T. R.; ORRISS, I. R. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. Purinergic signalling, v. 9, n. 4, p. 541-72, dez. 2013.

BUSTAMANTE, M. *et al.* Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca(2+) signals and an IL-6 autocrine loop. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, v. 306, n. 8, p. E869-82, abr. 2014.

CARDOSO, A. M. *et al.* Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. Molecular and Cellular Biochemistry, v. 371, n. 1-2, p. 147-156, dez. 2012.

CARDOSO, A. M. *et al.* Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from Nω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride induced hypertension rats. Journal of Hypertension, v. 33, n. 4, p. 763-772, abr. 2015.

CARDOSO, A. M. *et al.* Physical exercise prevents memory impairment in an animal model of hypertension through modulation of CD39 and CD73 activities and A2A receptor expression. Journal of Hypertension, v. 37, n. 1, p. 135-143, jul. 2018.

CASAS, M.; BUVINIC, S.; JAIMOVICH, E. ATP Signaling in Skeletal Muscle. Exercise and Sport Sciences Reviews, v. 42, n. 3, p. 110-116, jul. 2014.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. Public health reports, v. 100, n. 2, p. 126-31, 1985.

CODELLA, R. *et al.* May the force be with you: why resistance training is essential for subjects with type 2 diabetes mellitus without complications. Endocrine, v. 62, n. 1, p. 14-25, 2018.

CRECELIUS, A. R.; KIRBY, B. S.; DINENNO, F. A. Intravascular ATP and the Regulation of Blood Flow and Oxygen Delivery in Humans. Exercise and Sport Sciences Reviews, v. 43, n. 1, p. 5-13, jan. 2015.

FERNÁNDEZ-VERDEJO, R. *et al.* Exercise Sensitizes Skeletal Muscle to Extracellular ATP for IL-6 Expression in Mice. International Journal of Sports Medicine, v. 35, n. 04, p. 273-279, set. 2013.

FIUZA-LUCES, C. *et al.* Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors. Nature Reviews Cardiology, v. 15, n. 12, p. 731-743, 2018.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. Journal of applied physiology, v. 103, n. 2, p. 693-9, 2007.

GLEESON, M. *et al.* The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. Nature reviews Immunology, v. 11, n. 9, p. 607-615, 2011.

GRGIC, J. *et al.* Effects of caffeine intake on muscle strength and power: a systematic review and meta-analysis. Journal of the International Society of Sports Nutrition, v. 15, n. 1, p. 11, dez. 2018.

GULATI, P. *et al.* Amino Acids Activate mTOR Complex 1 via Ca2+/CaM Signaling to hVps34. Cell Metabolism, v. 7, n. 5, p. 456-465, may 2008.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. Regulation of inflammation by adenosine. Frontiers in immunology, v. 4, p. 85, 2013.

HAWLEY, J. A. *et al.* Integrative biology of exercise. Cell, v. 159, n. 4, p. 738-749, 2014.

HELLSTEN, Y. *et al.* Adenosine concentrations in the interstitium of resting and contracting human skeletal muscle. Circulation, v. 98, n. 1, p. 6-8, jul. 1998.

HELLSTEN, Y.; NYBERG, M. Cardiovascular Adaptations to Exercise

Training. *In*: Comprehensive Physiology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2015. v. 6, p. 1-32.

HOMSHER, E. *et al.* Calcium regulation of thin filament movement in an in vitro motility assay. Biophysical Journal, v. 70, n. 4, p. 1881-1892, abr. 1996.

ITO, N. *et al.* ATP-Induced Increase in Intracellular Calcium Levels and Subsequent Activation of mTOR as Regulators of Skeletal Muscle Hypertrophy. International Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 9, p. 2804, set. 2018.

JÄGER, R. *et al.* Oral adenosine-5'-triphosphate (ATP) administration increases blood flow following exercise in animals and humans. Journal of the International Society of Sports Nutrition, v. 11, n. 1, p. 28, jun. 2014.

JIMÉNEZ, C. M. *et al.* Extracellular ATP promotes protein synthesis in skeletal muscle through activation of the Akt-mTOR signaling pathway. The FASEB Journal, v. 32, n. 1_supplement, p. 856.29, 2018.

KLABUNDE, R. E. Conditions for dipyridamole potentiation of skeletal muscle active hyperemia. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, v. 250, n. 1, p. H62-H67, jan. 1986.

LANGFORT, J. *et al.* Effect of Various Types of Exercise Training on 5'-Nucleotidase and Adenosine Deaminase Activities in Rat Heart: Influence of a Single Bout of Endurance Exercise. Biochemical and Molecular Medicine, v. 59, n. 1, p. 28-32, out. 1996.

LAXSON, D. D.; HOMANS, D. C.; BACHE, R. J. Inhibition of adenosine-mediated coronary vasodilation exacerbates myocardial ischemia during exercise. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, v. 265, n. 5, p. H1471-H1477, nov. 1993.

LI, J.; KING, N. C.; SINOWAY, L. I. ATP concentrations and muscle tension increase linearly with muscle contraction. Journal of Applied Physiology, v. 95, n. 2, p. 577-583, ago. 2003.

MARSHALL, J. M. The roles of adenosine and related substances in exercise hyperaemia. The Journal of physiology, v. 583, n. Pt 3, p. 835-45, set. 2007.

MARTIN, K. *et al.* Mental Fatigue Impairs Endurance Performance: A Physiological Explanation. Sports Medicine, v. 48, n. 9, p. 2041-2051, set. 2018.

MAY, C. *et al.* Extracellular ATP activates ERK1/ERK2 via a metabotropic P2Y1 receptor in a Ca2+ independent manner in differentiated human skeletal muscle cells. Biochemical Pharmacology, v. 71, n. 10, p. 1497-1509, may 2006.

MCCORD, J. L.; TSUCHIMOCHI, H.; KAUFMAN, M. P. P2X2/3 and P2X3 receptors contribute to the metaboreceptor component of the exercise pressor reflex. Journal of Applied Physiology, v. 109, n. 5, p. 1416-1423, 2010.

MCGLORY, C.; DEVRIES, M. C.; PHILLIPS, S. M. Skeletal muscle and resistance exercise training; the role of protein synthesis in recovery and remodeling. Journal of Applied Physiology, v. 122, n. 3, p. 541-548, 2017.

MIRON, V. V. *et al.* High-intensity intermittent exercise increases adenosine

hydrolysis in platelets and lymphocytes and promotes platelet aggregation in futsal athletes. Platelets, p. 1-8, out. 2018.

MORTENSEN, S. P. *et al.* Two weeks of muscle immobilization impairs functional sympatholysis but increases exercise hyperemia and the vasodilatory responsiveness to infused ATP. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, v. 302, n. 10, p. H2074-H2082, may 2012a.

MORTENSEN, S. P. *et al.* Lifelong physical activity preserves functional sympatholysis and purinergic signalling in the ageing human leg. The Journal of physiology, v. 590, n. 23, p. 6227-36, 1 dez. 2012b.

MORTENSEN, S. P.; SALTIN, B. Regulation of the skeletal muscle blood flow in humans. Experimental Physiology, v. 99, n. 12, p. 1552-1558, dez. 2014.

NEWSHOLME, E. A. *et al.* Maximal activities of enzymes involved in adenosine metabolism in muscle and adipose tissue of rats under conditions of variations in insulin sensitivity. FEBS letters, v. 181, n. 1, p. 189-92, fev. 1985.

NIEMAN, D. *et al.* Effect of High-Versus Moderate-Intensity Exercise on Lymphocyte Subpopulations and Proliferative Response. International Journal of Sports Medicine, v. 15, n. 04, p. 199-206, may 1994.

OSORIO-FUENTEALBA, C. *et al.* Electrical Stimuli Release ATP to Increase GLUT4 Translocation and Glucose Uptake via PI3K -Akt-AS160 in Skeletal Muscle Cells. Diabetes, v. 62, n. 5, p. 1519-1526, 2012.

PEAKE, J. M. *et al.* Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. Journal of Applied Physiology, v. 122, n. 3, p. 559-570, 2017.

PEDERSEN, B. K. Muscle as a secretory organ. Comprehensive Physiology, v. 3, n. 3, p. 1337-1362, 2013.

PEDERSEN, L. *et al.* Voluntary running suppresses tumor growth through epinephrine- and IL-6-dependent NK cell mobilization and redistribution. Cell Metabolism, v. 23, n. 3, p. 554-562, 2016.

PESCATELLO, L. S. *et al.* ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. 9th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2014. 456 p.

ROQUE, F. R. *et al.* Moderate exercise training promotes adaptations in coronary blood flow and adenosine production in normotensive rats. Clinics, v. 66, n. 12, p. 2105-2111, 2011.

RUTKIEWICZ, J.; GÓRSKI, J. Effect of exercise on adenosine deaminase activity in rat skeletal muscles. Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society, v. 43, n. 3, p. 219-22, set. 1992.

SALTIN, B.; MORTENSEN, S. P. Inefficient functional sympatholysis is an overlooked cause of malperfusion in contracting skeletal muscle. The Journal of Physiology, v. 590, n. 24, p. 6269-6275, dez. 2012.

SANDONÀ, D. *et al.* Characterization of the ATP-hydrolysing activity of alpha-sarcoglycan. The Biochemical journal, v. 381, n. Pt 1, p. 105-12, jul. 2004.

SANDONÀ, D. *et al.* The T-tubule membrane ATP-operated P2X 4 receptor influences contractility of skeletal muscle. The FASEB Journal, v. 19, n. 9, p. 1184-1186, jul. 2005.

SCHWARTZ, L. M.; MCKENZIE, J. E. Adenosine and active hyperemia in soleus and gracilis muscle of cats. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, v. 259, n. 4, p. H1295–H1304, out. 1990.

SERRANO, A. L. *et al.* Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. Cell Metabolism, v. 7, n. 1, p. 33-44, 1 jan. 2008.

SIQUEIRA, I. R. *et al.* A neuroprotective exercise protocol reduces the adenine nucleotide hydrolysis in hippocampal synaptosomes and serum of rats. Brain Research, v. 1316, p. 173-180, fev. 2010.

SMITH, M. R. *et al.* Mental Fatigue and Soccer: Current Knowledge and Future Directions. Sports Medicine, v. 48, n. 7, p. 1525-1532, jul. 2018.

SPRAGUE, R. S. *et al.* Erythrocytes as controllers of perfusion distribution in the microvasculature of skeletal muscle. Acta Physiologica, v. 202, n. 3, p. 285-292, jul. 2011.

STANFORD, K. I.; GOODYEAR, L. J. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. Advances in Physiology Education, v. 38, n. 4, p. 308-314, dez. 2014.

SUK KIM, M. *et al.* ATP stimulates glucose transport through activation of P2 purinergic receptors in C2C12 skeletal muscle cells. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 401, n. 2, p. 205–214, may 2002.

SUSHANT, R. *et al.* Effect of Prolonged Adenosine Infusion on Resting Forearm Vasodilatory Responses and Exercise Hyperemia. The FASEB Journal, v. 30, n. 1_supplemen, p. 763.6, 2016.

WACKERHAGE, H. *et al.* Stimuli and sensors that initiate skeletal muscle hypertrophy following resistance exercise. Journal of Applied Physiology, v. 126, n. 1, p. 30-43, 2019.

WEDELL-NEERGAARD, A.-S. *et al.* Exercise-Induced Changes in Visceral Adipose Tissue Mass are Regulated by IL-6 Signaling: A Randomized Controlled Trial. Cell Metabolism (In Press), p. 1–12, 2018.

WHITHAM, M.; FEBBRAIO, M. A. The ever-expanding myokinome: discovery challenges and therapeutic implications. Nature Reviews Drug Discovery, v. 15, n. 10, p. 719-729, 2016.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research, v. 1783, n. 5, p. 673-694, may 2008.

MOLÉCULAS NUTRACÊUTICAS E SISTEMA PURINÉRGICO

Charles Elias Assmann
Pauline da Costa

INTRODUÇÃO

O termo nutracêutico (em inglês, *nutraceutical*) surgiu da união das palavras "nutrição" (em inglês, *nutrition*) e "farmacêutico" (em inglês, *pharmaceutical*) e foi primeiro cunhado por Stephen L. DeFelice em 1989, que também estabeleceu a Fundação para Inovação em Medicina (do inglês, *The Foundation for Innovation in Medicine*) em 1976 (DeFelice, 1995).

O conceito de nutracêutico pode ser ampliado para definir qualquer substância, podendo ser considerada alimento ou parte de um alimento, como um suplemento dietético, nutrientes isolados, alimentos produzidos por meio de engenharia genética, produtos à base de plantas e alimentos processados, que possui algum benefício médico ou para a saúde, incluindo a prevenção ou tratamento de doenças, por possuir atividades biológicas e desempenharem funções fisiológicas para o organismo (Andlauer; Fürst, 2002; Defelice, 1995; Sauer; Plauth, 2017).

Entretanto, na literatura, as definições para nutracêutico podem variar e, algumas vezes, mesclam-se com as definições de alimento funcional. Para alguns, a palavra nutracêutico também é sinônimo de alimento funcional, podendo ser definido como um gênero alimentício, aditivo alimentar ou suplemento dietético que possui efeitos fisiológicos benéficos, mas que pode não ser essencial para a dieta. Outros significados também encontrados na literatura científica incluem

as definições de suplemento dietético, alimento ou alimento médico com um benefício capaz de prevenir ou diminuir o risco de uma doença ou condição de saúde associada, bem como sendo seguro para o consumo humano na quantidade e frequência requerida para atingir tais propriedades (Aronson, 2017; Gul; Singh; Jabeen, 2016).

O termo alimento funcional foi inserido primeiramente na literatura japonesa em 1984, um pouco depois da introdução do termo nutracêutico, cunhado por DeFelice. Esse termo denota que esses alimentos estão diretamente envolvidos com a modificação benéfica de sistemas fisiológicos como o sistema circulatório, endócrino, imune, e digestivo, entre outros (Arai, 2009). Apesar de ainda não haver definições usadas internacionalmente para os termos nutracêuticos e alimentos funcionais e de que esses termos se misturem em algumas referências, utilizaremos como base a definição inicial cunhada por DeFelice.

Nos últimos anos, há crescentes estudos na literatura a respeito da relação entre moléculas com potencial nutracêutico e o sistema purinérgico. Esse sistema é composto fundamentalmente de um conjunto de enzimas transmembranas, como a Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (NTPDase), Ecto-5'-nucleotidase (Ecto-5'-NT), Nucleotídeo Pirofosfatase/Difosfodiesterase (NPP) e Adenosina desaminase (ADA) que hidrolisam e degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina como a adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) e adenosina (ADO). Além disso, diversos receptores acoplados a membranas, subdivididos em receptores do subtipo P2 e P1, ligam especificamente às moléculas sinalizadoras desencadeando respostas celulares dependendo do tipo celular no qual se encontram expressos (Junger, 2011; Yegutkin, 2008).

Nas células do sistema imunológico, especialmente, enzimas, receptores e moléculas sinalizadoras integrantes do sistema purinérgico auxiliam na regulação de diversas funções imunes, podendo desencadear respostas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo do tipo celular, condições fisiológicas e dos estímulos a que essas células são submetidas (Cekic; Linden, 2016; Junger, 2011).

Dessa forma, neste capítulo, abordaremos algumas das principais moléculas com potencial nutracêutico, no sentido de possuírem algum efeito fisiológico benéfico para a saúde humana, em relação ao sistema purinérgico, enfatizando a modulação em componentes desse sistema, como enzimas, receptores e moléculas sinalizadoras, tais como ATP, ADP, AMP e ADO.

Antocianinas

As antocianinas são flavonoides polifenólicos altamente solúveis em água, que se encontram dissolvidas na seiva vacuolar dos tecidos epidérmicos de diversas flores, frutos e vegetais, dando a eles a cor rosa, vermelha, azul ou roxa, dependendo do pH do meio (Andersen; Markham, 2005; Manach *et al.*, 2004). Existem muitas variedades desses pigmentos na natureza, contudo se destacam seis: cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina, os quais estão mais comumente presentes nas plantas. Na dieta humana, as antocianinas são abundantes em frutas como uvas, cassis, amoras, morangos, mirtilos, e nos produtos industrializados derivados destes (vinhos, sucos, extratos, geleias, etc.), além de serem encontrados em cereais, folhas e raízes de vegetais como feijão, hibisco, berinjela, repolho-roxo, rabanete e muitos outros (Beattie; Crozier; Duthie, 2005; Manach *et al.*, 2004; Sakakibara *et al.*, 2003).

O estudo desses compostos naturais tem sido de amplo interesse, devido suas propriedades antioxidantes e neuroprotetoras, e por estarem envolvidos no catabolismo extracelular de nucleotídeos (Carvalho *et al.*, 2016; Gutierres *et al.*, 2014; Pacheco *et al.*, 2018a). As antocianinas possuem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e prevenir o aumento da atividade das enzimas NTPDase (utilizando ATP como substrato) em córtex cerebral e hipocampo, e da mesma enzima (utilizando ADP como substrato) em hipocampo de animais no modelo de amnésia induzida por escopolamina. Além disso, este nutracêutico impediu a diminuição da atividade da Ecto-5'-NT e o aumento da atividade ADA em hipocampo neste mesmo estudo de perda de memória, prevenindo uma redução dos níveis de ATP e de ADO extracelular na fenda sináptica, o que poderia comprometer a sinalização purinérgica e afetar a formação de memória. Dessa forma, o tratamento com antocianinas restabeleceu os níveis de ATP no cérebro, sugerindo um efeito neuroprotetor sobre as atividades das ectonucleotidases e o metabolismo energético neuronal (Gutierres *et al.*, 2012).

Berberina

A berberina é um alcaloide presente na matriz química de uma variedade de plantas medicinais, como as do gênero *Berberis* (*B. aquifolium, B. vulgaris, B. aristata*), entre outras, e que possui diversas propriedades farmacológicas. Diversos estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram os efeitos benéficos da berberina contra doenças de origem metabólica, cardiovascular e neurológica (Ahmed *et al.*, 2015; Cicero; Baggioni, 2016; Kumar *et al.*, 2015). Importantes atividades antioxidantes e anti-inflamatórias para esta molécula foram encontradas em estudos *in vitro*. Com relação a modelos animais e humanos, a berberina demonstrou possuir efeitos cardiovasculares, por diminuir níveis de lipídios e melhorar as funções endoteliais e saúde dos vasos sanguíneos, e neuroprotetora, potencialmente devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Cicero; Baggioni, 2016; Kumar *et al.*, 2015). Além disso, diversos metabólitos derivados do metabolismo da berberina, como a columbamina e a berberrubina, também têm mostrado efeitos farmacológicos similares à berberina, como anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, neuroprotetora, hipolipimiante, entre outras (Wang *et al.*, 2017). Essa substância e seus metabólitos têm sido, portanto, cada vez mais estudados com o intuito de sua utilização na prevenção e no tratamento de doenças cardiometabólicas e neurológicas.

Um estudo publicado recentemente investigou o efeito da berberina, em duas doses (50 e 100 mg/kg), em parâmetros de estresse oxidativo, comportamentais de memória e neurotransmissão purinérgica, em um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer induzida por uma injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em ratos. Os resultados encontrados corroboram a literatura, mostrando que a molécula exerce efeitos protetores contra prejuízos de memória e danos oxidativos frente ao modelo de demência esporádica. Em relação a componentes do sistema purinérgico, este estudo demonstrou que a berberina preveniu a diminuição da atividade das enzimas NTPDase, Ecto-5'-NT e ADA em sinaptossomas de córtex cerebral e hipocampo. De acordo com esses resultados, os autores sugerem que a berberina desempenha um papel neuroprotetor contra danos cognitivos, especialmente de memória, e oxidativos, além de proteger contra as disfunções geradas na sinalização purinérgica no modelo de demência esporádica (De Oliveira *et al.*, 2018).

Café, cafeína, ácido cafeico e ácido clorogênico

A cafeína, o ácido clorogênico e o ácido cafeico são compostos naturalmente encontrados em muitas ervas, vegetais e frutos, sendo isolados, principalmente, do café (Anwar *et al.*, 2013). O café foi descoberto na Etiópia há milhares de anos e vem sendo mundialmente consumido na forma de bebida, associado aos hábitos sociais e a culturais de cada indivíduo (Stefanello *et al.*, 2019). Além dos compostos fenólicos, como o ácido clorogênico e o ácido cafeico, as atividades biológicas do café também são atribuídas aos terpenos e alcaloides, sendo o alcaloide cafeína o mais conhecido. O café e suas substâncias bioativas têm demonstrado propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hipoglicemiantes, neuroprotetoras e cardioprotetoras (Andersen *et al.*, 2006; Cunha; Agostinho, 2010; Stefanello *et al.*, 2016, 2019; Vieira *et al.*, 2017).

Estudos também revelaram os efeitos protetores do café sobre o sistema purinérgico, uma vez que o tratamento com 0,5 mg/kg de café (*Coffee arabica*) aumentou a atividade das enzimas NTPDase, usando ADP como substrato, e Ecto-5'-NT em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Esse efeito pode ter ocorrido devido ao aumento na concentração dos nucleotídeos no grupo de ratos diabéticos tratados com café. No entanto, nas plaquetas deste mesmo grupo foi constatada uma diminuição na atividade da NTPDase (ATP e ADP), o que contribui para uma redução da agregação plaquetária (Stefanello *et al.*, 2016).

Em pesquisas com cafeína, substância pertencente à classe das metilxantinas e estimulante do SNC, foi observado um antagonismo dos receptores A1 e A2A, reduzindo o efeito inibitório da adenosina, sendo esse o provável mecanismo do efeito neuroprotetor da cafeína sobre os déficits de memória induzidos por escopolamina (Pagnussat *et al.*, 2015). A cafeína, o ácido cafeico e as várias combinações de ambos também promoveram uma inibição na atividade da NTPDase e Ecto-5'-NT em córtex cerebral e cérebro total menos o córtex de animais, o que pode reduzir a hidrólise do ATP, indicando um efeito neuroprotetor (Akomolafe *et al.*, 2017).

Além disso, a administração de 10, 50 e 100 mg/kg de ácido cafeico durante 30 dias reduziu a hidrólise de ATP e AMP, enquanto a hidrólise do ADP foi aumentada em plaquetas de ratos. A atividade das enzimas NPP e ADA também foi aumentada nas plaquetas dos animais tratados com esse composto. Assim, os níveis

extracelulares de ADP podem ser diminuídos, indicando um papel antiagregante e reduzindo o risco de doenças cardiovasculares. Nos linfócitos, esse composto fenólico causou um aumento na atividade da NTPDase e da ADA nos animais tratados com ácido cafeico. Esse aumento da NTPDase possivelmente induz o decréscimo nos níveis de ATP, o que diminui a inflamação (Anwar *et al.*, 2013).

O papel modulatório do ácido clorogênico sobre sistema purinérgico também é observado na literatura. O tratamento com ácido clorogênico durante 30 dias teve efeito inibitório na atividade da NTPDase (ATP e ADP) e aumentou a atividade da Ecto-5'-NT em plaquetas de ratos diabéticos. Esse resultado pode indicar um efeito benéfico, devido a sua capacidade em controlar os níveis de ATP e ADP e aumentar a produção de ADO que, por sua vez, pode exercer ação antiplaquetária (Stefanello *et al.*, 2016). O ácido clorogênico preveniu a diminuição da atividade da enzima NPP e o aumento da atividade da Ecto-5'-NT em plaquetas de ratos desmielinizados com brometo de etídio. Esse resultado demonstra o envolvimento da NPP no processo de desmielinização ligado à esclerose múltipla, pois a enzima pode modular respostas imunes e inflamatórias na patogênese da doença. Sugere-se ainda que o ácido clorogênico pode levar a uma elevação nos níveis de AMP que, subsequentemente, serão hidrolisados pela Ecto-5'-NT, aumentando os níveis de adenosina, a qual exerce um efeito anti-inflamatório, imunossupressor e antiagregante (Leal *et al.*, 2016).

Curcumina

A curcumina (diferuloilmetano) é um pigmento amarelo alaranjado derivado do rizoma da planta cúrcuma (Curcuma longa Linn), popularmente conhecida como açafrão-da-índia (Agrawal *et al.*, 2010). Esse composto natural vem sendo utilizado por milhares de anos como corante e aditivo alimentar, principalmente, em países asiáticos como a Índia e a China (Abbasi *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2011). Sendo também utilizada na medicina tradicional destes países, pois possui numerosas propriedades farmacológicas, como as atividades antimicrobiana (De *et al.*, 2009), anticarcinogênica (Shishodia; Chaturvedi; Aggarwal, 2007), antioxidante (Reeta; Mehla; Gupta, 2009), hipoglicemiante (Kuhad; Chopra, 2007), cardioprotetora (Aggarwal; Harikumar, 2009). Além disso, estudos experimentais

têm demonstrado que a curcumina está envolvida na modulação da sinalização purinérgica (Da Costa *et al.*, 2017; Jaques *et al.*, 2011a, b, c).

O tratamento com curcumina foi capaz de prevenir alterações na atividade das enzimas NTPDase em plaquetas, linfócitos periféricos e pulmonares (Jaques *et al.*, 2011c), e da Ecto-5'-NT em plaquetas de ratos expostos de forma passiva à fumaça de cigarro. Assim, sugere-se que esse polifenol exerceu efeitos antiagregantes e anti-inflamatórios, uma vez que preveniu a redução da hidrólise do ADP em plaquetas, o qual estimula a agregação plaquetária, bem como inibiu o acúmulo de ATP, nucleotídeo ligado à indução de respostas pró-inflamatórias, em linfócitos periféricos e pulmonares de animais de expostos à fumaça de cigarro (Jaques *et al.*, 2011a, 2011c).

O envolvimento do sistema purinérgico na neurotransmissão, neuromodulação e plasticidade sináptica está bem descrito na literatura (Bagatini *et al.*, 2018; Burnstock, 2006). Dessa forma, estudos evidenciam o potencial neuroprotetor da curcumina, a qual foi eficaz em prevenir o aumento da atividade da NTPDase e a redução da Ecto-5'-NT em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos expostos ao cádmio (Da Costa *et al.*, 2017). Além de impedir alterações nas atividades dessas ectonucleotidases em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos expostos à fumaça de cigarro, o que previne alterações nas concentrações dos nucleotídeos e mantém a homeostase no sistema nervoso central (SNC) (Jaques *et al.*, 2011b).

Lingonberry

Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L., Ericaceae), como são chamadas as pequenas frutas de coloração vermelha oriundas de arbustos verdes nativos das florestas boreais e de regiões da tundra do hemisfério norte, são ricas em diversos compostos bioativos como antocianinas, catequinas, epicatequina, quercetina, kaempferol, entre outros (Ek *et al.*, 2006). Diversos estudos têm reportado importantes atividades biológicas para esses frutos, destacando-se especialmente a sua atividade antioxidante e também neuroprotetora, relacionadas ao conteúdo de moléculas bioativas presentes nos frutos. Um estudo publicado recentemente avaliou e comparou as propriedades fitoquímicas e a capacidade antioxidante dos extratos de *lingonberry* e de *blueberry* (mirtilo, *Vaccinium myrtillus* L.), mostrando que o extrato de *lingonberry* apresentou maior conteúdo de compostos

fenólicos e de flavonoides totais em relação a *blueberry*. Entretanto, o conteúdo de antocianinas e a capacidade antioxidante foi maior para *blueberry* em relação ao *lingonberry* (Dróżdż; Šėžienė; Pyrzynska, 2017). Estudos recentes também demonstraram que as antocianinas presentes no fruto foram capazes de proteger células cardíacas da apoptose induzida pelo estresse oxidativo (Isaak *et al.*, 2017). Além disso, outro estudo demonstrou efeitos neuroprotetores do extrato de *lingonberry*, protegendo astrócitos tratados com lipopolissacarídeo contra danos de estresse oxidativo, danos colinérgicos e de viabilidade celular (Pacheco *et al.*, 2018b).

Nesse mesmo sentido, um outro estudo também demonstrou efeitos neuroprotetores do extrato de *lingonberry* por meio da redução do estresse oxidativo e da regulação de componentes do sistema purinérgico em ratos submetidos a um modelo de diabetes mellitus do tipo 1. Com relação a componentes do sistema purinérgico, os autores investigaram a modulação da atividade das enzimas NTPDase, Ecto-5'-NT e ADA, bem como a densidade de receptores do tipo A1, A2A e P2X7 através das análises de Western Blot. Os resultados mostraram que o extrato de lingonberry aumentou a atividade da enzima NTPDase no grupo diabético e tratado com o extrato em relação ao grupo diabético que recebeu salina. Com relação aos resultados da densidade de receptores purinérgico, o extrato de *lingonberry* foi capaz de restabelecer a densidade dos receptores avaliados para níveis similares ao do controle não diabético tratado apenas com salina (Reichert *et al.*, 2018).

Quercetina

A quercetina (3,5,7,3',4'- pentahidroxiflavona) é um dos flavonoides mais difundidos no reino vegetal e ingeridos na dieta humana, pois está presente uma ampla variedade de frutas, legumes, vegetais, chás e vinhos, sendo a cebola, a maçã, a couve e o brócolis suas principais fontes (Murota; Terao, 2003). O consumo desse composto está associado a benefícios para a saúde e a proteção contra o desenvolvimento de muitas doenças, devido suas atividades antioxidantes, antivirais, anticarcinogênica, e sua capacidade de reduzir o risco de doenças cardiovasculares, distúrbios metabólicos e neurodegenerativos (Baldissarelli *et al.*, 2016; Braun *et al.*, 2018; Kihira *et al.*, 2011). Além disso, estudos têm evidenciado

outras propriedades farmacológicas da quercetina, uma vez que esse composto modula a sinalização purinérgica em diferentes modelos experimentais.

Em um modelo de hipotireoidismo, a quercetina inibiu a atividade das enzimas NTPDase (ATP e ADP), Ecto-5'-NT e ADA em plaquetas e em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos saudáveis e doentes, o que pode reduzir a hidrólise dos nucleotídeos de adenina e aumentar os níveis de adenosina, que atua como uma molécula antiagregante e neuroprotetora, contribuindo na prevenção da aterosclerose e de danos neuronais induzidos pelo hipotireoidismo (Baldissarelli *et al.*, 2016, 2017). A quercetina também preveniu o aumento da atividade dessas enzimas em linfócitos periféricos e sinaptossomas de córtex cerebral de ratos intoxicados por cádmio, exibindo propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras (Abdalla *et al.*, 2013, 2014). Em adição, o pré-tratamento com quercetina também impediu o aumento das enzimas NTPDase e ADA em linfócitos e promoveu uma diminuição dos níveis séricos de ATP e ADP em ratos hiperlipidêmicos, possivelmente devido suas atividades anti-inflamatórias e hipolipidêmicas, pois diminuiu os níveis dos nucleotídeos envolvidos em funções pró-inflamatórias, bem como reduziu os níveis de lipídios e lipoproteínas plasmáticas, contribuindo para um efeito terapêutico anti-aterogênico (Braun *et al.*, 2018). No entanto, esse composto causou um aumento na atividade da NTPDase e uma diminuição da ADA em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, podendo ser um mecanismo protetor contra a deterioração cognitiva induzida pelo diabetes *mellitus* (Maciel *et al.*, 2016).

Alguns autores também têm relatado efeitos antiproliferativos da quercetina sobre células tumorais, devido à inibição da atividade e expressão da Ecto-5'-NT/CD73 na linhagem celular humana U138MG de glioma, bem como à redução da atividade dessa enzima nas células humanas T24 de câncer de bexiga. Essas alterações podem resultar no acúmulo de AMP com consequente diminuição na ADO extracelular, nucleosídeo ativador de vias proliferativas, enquanto o AMP tem efeito oposto, o que reduz a progressão dos tumores (Braganhol *et al.*, 2007; Rockenbach *et al.*, 2013).

Resveratrol

O resveratrol, composto polifenólico, quimicamente conhecido por 3,5,4-tri--hidroxi-estilbeno, está presente em alimentos como framboesa, amora, amendoim e, principalmente, nas uvas e nos vinhos tintos (Saiko *et al.*, 2008). Sua estrutura é sintetizada nas formas isômeras *trans* e *cis*, sendo a forma *trans* responsável pelas inúmeras funções biológicas do resveratrol, como anti-inflamatória, antioxidante, cardioprotetora, quimiopreventiva e neuroprotetora (King; Bomser; Min, 2006).

Pesquisas revelaram que o resveratrol age contra convulsões induzidas por pentilenetetrazol. Esse papel anticonvulsivante pode ocorrer pela estimulação da liberação de ADO endógena, uma vez que esse nucleosídeo é um neurotransmissor inibitório, sugerindo um mecanismo de proteção do resveratrol sobre o sistema adenosinérgico (Gupta; Chaudhary; Srivastava, 2002). O tratamento com resveratrol aumentou a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, através do aumento da atividade das enzimas NTPDase, Ecto-5'-NT, NPP e ADA em sinaptossomas e plaquetas de animais com diabetes induzida por estreptozotocina. Esses resultados demonstraram que o resveratrol pode contribuir para aumento da produção de adenosina, molécula neuroprotetora, antiagregante e vasodilatadora, que protege o SNC de complicações neurológicas e condições pró-trombóticas observadas no estado hiperglicêmico (Schmatz *et al.*, 2009a, 2009b).

Sabe-se também que o diabetes tipo 2 está associado ao aumento dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres (AGLs), que, por sua vez, induz a liberação de IL-6 pró-inflamatória mediada pela ativação dos receptores P2X7, o que leva a um alto risco de neuropatias diabéticas. Assim, os resultados mostram que o resveratrol inibiu o aumento da expressão do receptor P2X7 através da supressão da P38 via MAPK, atenuando a liberação de IL-6 em células PC12 cultivadas com altos níveis de AGLs, reafirmando sua ação protetora contra complicações neurais no diabetes (Xu *et al.*, 2014).

Estudos recentes também confirmam os efeitos neuroprotetores e neuromoduladores do resveratrol na via purinérgica, devido à restauração das atividades das enzimas NTPDase, Ecto-5'-NT e ADA em células progenitoras neuronais infectadas com *Toxoplasma gondii*. Além disso, esse nutracêutico preveniu o aumento da expressão do receptor P2X7, inibindo a liberação de vários fatores pró--inflamatórios e modulando a resposta imune contra *T. gondii* (Bottari *et al.*, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversas moléculas com potencial nutracêutico têm mostrado possuir efeito em componentes do sistema purinérgico, seja na atividade de enzimas, na expressão de receptores ou na modulação da concentração das moléculas sinalizadoras, como ATP, ADP e ADO. Os efeitos relatados na literatura demonstram, de maneira geral, uma regulação benéfica a nível de sistema purinérgico e, com isso, podem possuir atividades neuroprotetoras, antioxidantes, anti-inflamatórias, cardioprotetoras, entre outras, necessárias para a homeostasia do organismo. Estudos futuros se fazem necessários para continuar elucidando quais os mecanismos que moléculas e alimentos nutracêuticos agem a nível de sistema purinérgico e seu possível impacto na prevenção ou reversão de doenças.

REFERÊNCIAS

ABBASI, M. A. *et al.* Curcumin and its derivatives: Moderate inhibitors of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and trypsin. Scientia Iranica, 2012.

ABDALLA, F. H. *et al.* Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. Molecular and Cellular Biochemistry, 2013.

ABDALLA, F. H. *et al.* Protective effect of quercetin in ecto-enzymes, cholinesterases, and myeloperoxidase activities in the lymphocytes of rats exposed to cadmium. Molecular and Cellular Biochemistry, v. 396, n. 1-2, 2014.

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseasesInternational Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2009.

AGRAWAL, R. *et al.* Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. Pharmacological Research, 2010.

AHMED, T. *et al.* Berberine and neurodegeneration: A review of literaturePharmacological Reports, 2015.

AKOMOLAFE, S. F. *et al.* Effect of caffeine, caffeic acid and their various combinations on enzymes of cholinergic, monoaminergic and purinergic systems critical to neurodegeneration in rat brain in vitro. NeuroToxicology, 2017.

ANDERSEN, L. F. *et al.* Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study. American Journal of Clinical Nutrition, 2006.

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. [s.l: s.n.].

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: A piece of history, present status and outlook. Food Research International. Anais...2002

ANWAR, J. *et al.* Caffeic acid treatment alters the extracellular adenine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. Food and Chemical Toxicology, 2013.

ARAI, S. Studies on Functional Foods in Japan—State of the Art. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009.

ARONSON, J. K. Defining 'nutraceuticals': neither nutritious nor pharmaceuticalBritish Journal of Clinical Pharmacology, 2017.

BAGATINI, M. D. *et al.* The Impact of Purinergic System Enzymes on Noncommunicable, Neurological, and Degenerative Diseases. Journal of Immunology Research, v. 2018, p. 1-21, 2018.

BALDISSARELLI, J. *et al.* Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2016.

BALDISSARELLI, J. *et al.* Hypothyroidism Enhanced Ectonucleotidases and Acetylcholinesterase Activities in Rat Synaptosomes can be Prevented by the Naturally Occurring Polyphenol Quercetin. Cellular and Molecular Neurobiology, 2017.

BEATTIE, J.; CROZIER, A.; DUTHIE, G. Potential Health Benefits of Berries. Current Nutrition & Food Science, 2005.

BOTTARI, N. B. *et al.* Resveratrol-mediated reversal of changes in purinergic signaling and immune response induced by Toxoplasma gondii infection of neural progenitor cells. Purinergic Signalling, 2018.

BRAGANHOL, E. *et al.* Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line. Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects, 2007.

BRAUN, J. B. S. *et al.* Pretreatment with quercetin prevents changes in lymphocytes E-NTPDase/E-ADA activities and cytokines secretion in hyperlipidemic rats. Molecular and Cellular Biochemistry, 2018.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitterTrends in Pharmacological Sciences, 2006.

CARVALHO, F. B. *et al.* Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide. Mol Neurobiol, 2016.

CEKIC, C.; LINDEN, J. Purinergic regulation of the immune system. Nature Reviews Immunology, 2016.

CICERO, A. F. G.; BAGGIONI, A. Berberine and its role in chronic disease in Advances in Experimental Medicine and Biology. [s.l: s.n.].

CUNHA, R. A.; AGOSTINHO, P. M. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. Journal of Alzheimer's Disease. Anais...2010

DA COSTA, P. *et al.* Curcumin attenuates memory deficits and the impairment of cholinergic and purinergic signaling in rats chronically exposed to cadmium. Environmental Toxicology, v. 32, n. 1, 2017.

DE OLIVEIRA, J. S. *et al.* Neuroprotective effects of berberine on recognition memory impairment, oxidative stress, and damage to the purinergic system in rats submitted to intracerebroventricular injection of streptozotocin. Psychopharmacology, 2018.

DE, R. *et al.* Antimicrobial activity of curcumin against helicobacter pylori isolates from India and during infections in mice. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009.

DEFELICE, S. L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. Trends in Food Science and Technology, 1995.

DRÓŻDŻ, P.; ŠĖŽIENĖ, V.; PYRZYNSKA, K. Phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Extracts from Wild Blueberries and Lingonberries. Plant Foods for Human Nutrition, 2017.

EK, S. *et al.* Characterization of phenolic compounds from lingonberry

(Vaccinium vitis-idaea). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006.

GUL, K.; SINGH, A. K.; JABEEN, R. Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future WorldCritical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016.

GUPTA, Y. K.; CHAUDHARY, G.; SRIVASTAVA, A. K. Protective effect of resveratrol against pentylenetetrazole-induced seizures and its modulation by an adenosinergic system. Pharmacology, 2002.

GUTIERRES, J. M. *et al.* Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. Life Sci, v. 91, n. 23-24, p. 1221–1228, 2012.

GUTIERRES, J. M. *et al.* Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. Int J Dev Neurosci, v. 33, p. 88-97, 2014.

ISAAK, C. K. *et al.* Lingonberry anthocyanins protect cardiac cells from oxidative-stress-induced apoptosis. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2017.

JAQUES, J. A. DOS S. *et al.* Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin. Biomedicine and Preventive Nutrition, 2011a.

JAQUES, J. A. DOS S. *et al.* The effect of curcumin in the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats. Cell Biochemistry and Function, 2011b.

JAQUES, J. A. DOS S. *et al.* Effects of curcumin on the activities of the enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from cigarette smoke-exposed rats. Cell Biochemistry and Function, 2011c.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling Nature Reviews Immunology, 2011.

KIHIRA, Y. *et al.* Pharmacology in Health Food: Metabolism of Quercetin In Vivo and Its Protective Effect Against Arteriosclerosis. Journal of Pharmacological Sciences, 2011.

KING, R. E.; BOMSER, J. A.; MIN, D. B. Bioactivity of resveratrolComprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2006.

KUHAD, A.; CHOPRA, K. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: Behavioral and biochemical evidences. European Journal of Pharmacology, 2007.

KUMAR, A. *et al.* Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An updateEuropean Journal of Pharmacology, 2015.

LEAL, C. A. M. *et al.* Effects of chlorogenic acid on adenine nucleotides hydrolyzing enzyme activities and expression in platelets of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2016.

MACIEL, R. M. *et al.* Neuroprotective effects of quercetin on memory and anxiogenic-like behavior in diabetic

rats: Role of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2016.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MUROTA, K.; TERAO, J. Antioxidative flavonoid q uercetin: Implication of its intestinal absorption and metabolism. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003.

PACHECO, S. M. *et al.* Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, o xidative s tress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. J Nutr Biochem, v. 56, p. 193-204, 2018a.

PACHECO, S. M. *et al.* Glioprotective Effects o f L ingonberry E xtract Against Altered Cellular Viability, Acetylcholinesterase Activity, and Oxidative Stress in Lipopolysaccharide-Treated Astrocytes. Cellular and Molecular Neurobiology, 2018b.

PAGNUSSAT, N. *et al.* Adenosine A2A receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. British Journal of Pharmacology, 2015.

REETA, K. H.; MEHLA, J.; GUPTA, Y. K. Curcumin is protective against phenytoin-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. Brain Research, 2009.

REICHERT, K. P. *et al.* Lingonberry Extract Provides Neuroprotection by Regulating the Purinergic System and Reducing Oxidative Stress in Diabetic Rats. Molecular Nutrition and Food Research, 2018.

ROCKENBACH, L. *et al.* Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 2013.

SAIKO, P. *et al.* Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?Mutation Research. Reviews in Mutation Research, 2008.

SAKAKIBARA, H. *et al.* Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003.

SAUER, S.; PLAUTH, A. Health-beneficial nutraceuticals – amyth or reality?Applied Microbiology and Biotechnology, 2017.

SCHMATZ, R. *et al.* Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sciences, 2009a.

SCHMATZ, R. *et al.* Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. Brain Research Bulletin, 2009b.

SHISHODIA, S.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Role of Curcumin in Cancer Therapy. Current Problems in Cancer, v. 31, n. 4, p. 243-305, 2007.

STEFANELLO, N. *et al.* Effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on components of the purinergic system

of streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Nutritional Biochemistry, 2016.

STEFANELLO, N. *et al.* Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. Food and Chemical Toxicology, 2019.

VIEIRA, J. M. *et al.* Caffeine prevents high-intensity exercise-induced increase in enzymatic antioxidant and Na+-K+-ATPase activities and reduction of anxiolytic like-behaviour in rats. Redox Report, 2017.

WANG, K. *et al.* The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. Drug Metabolism Reviews, 2017.

XU, H. *et al.* Trans-Resveratrol Attenuates High Fatty Acid-Induced P2X7 Receptor Expression and IL-6 Release in PC12 Cells: Possible Role of P38 MAPK Pathway. Inflammation, 2014.

YADAV, R. S. *et al.* Neuroprotective efficacy of curcumin in arsenic induced cholinergic dysfunctions in rats. NeuroToxicology, 2011.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research, 2008.

CÂNCER DE COLO UTERINO

Marta Schmidt Pfaffenzeller
Maria Luiza Mukai Franciosi
Andréia Machado Cardoso

INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino (CCU) caracteriza-se como o quarto tipo de câncer mais incidente e fatal na população mundial do sexo feminino. Fator que, em números, representa 569.847 novos casos e 311.365 mortes apenas no ano de 2018 (Globocan, 2018). Ademais, a mortalidade desse tipo de câncer em países em desenvolvimento é o dobro quando comparada a um país desenvolvido (Siegel; Miller; Jemal, 2019). Esse dado relaciona-se com o tempo de diagnóstico e o acesso ao tratamento oferecido por tais países (Campion; Canfell, 2015).

O CCU desenvolve-se, necessariamente, a partir da infecção persistente de um dos tipos carcinogênicos do papillomavírus humano (HPV) (Chen *et al.*, 2018). A transmissão desse vírus ocorre por meio do contato físico e sexual, infectando as regiões da pele e da mucosa (Schiffman *et al.*, 2016). No CCU, especificamente, a persistência da infecção pelo HPV pode gerar neoplasias intraepiteliais (NICs), lesões pré-cancerígenas que apontam a potencialidade da lesão tornar-se um câncer invasivo (Campion; Canfell, 2015).

O microambiente tumoral do CCU distingue-se, ainda, por apresentar concentrações elevadas de ATP e adenosina – além de outros nucleotídeos – no meio extracelular do microambiente tumoral. Há, dessa forma, a ligação entre o sistema purinérgico e a progressão e persistência das células tumorais (Maldonado *et al.*, 2012). A explicação para esse fato está na importância dos nucleotídeos

extracelulares na sinalização molecular de diversos processos biológicos, como a proliferação, a diferenciação e o crescimento celular, bem como a mediação de respostas do sistema imune (Lee *et al.*, 2006). Assim, este capítulo abordará a relação entre os componentes do sistema purinérgico e o desenvolvimento de câncer no colo uterino.

Lesão Intraepitelial e Carcinoma do Colo Uterino

A maioria das infecções associadas ao HPV é tratada espontaneamente pelo sistema imunológico (Zhang *et al.*, 2018). Tal afirmação sustenta-se na característica imunogênica dos tumores induzidos por vírus oncogênicos, ou seja, o aparato imunológico reconhece os peptídeos virais presentes no tumor como antígenos estranhos (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015). Caso o mecanismo de defesa celular seja inefetivo, haverá a possibilidade de a infecção persistir em um processo oncogênico (Zhang *et al.*, 2018). A sinalização do sistema purinérgico age, desse modo, por meio do estímulo ou inibição da resposta imune, crescimento tumoral e metaplasia (Di Virgilio, 2012).

A classificação dos tipos de HPV é conduzida pelos diferentes graus carcinogênicos que esse vírus apresenta. Dessa forma, os tipos de baixo risco, como o HPV6 e HPV11, associam-se ao aparecimento do condiloma acuminado, tumor benigno presente na região genital (Schiffman *et al.*, 2016). Quanto aos de alto risco, estabeleceram-se 12 tipos principais: HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59. O HPV68, particularmente, é considerado um provável oncogênico em raros casos (Bouvard *et al.*, 2009).

Os tipos de HPV de alto risco geram instabilidade genética através da integração ao genoma celular. Essa instabilidade relaciona-se com a ação das oncoproteínas E6 e E7, que participam da danificação do DNA celular e do processo mitótico (Krump; You, 2018). Em estudo de coorte, identificou-se a porcentagem dos tipos de HPV carcinogênicos mais comuns. Dentre eles, o HPV16 esteve presente em 60% dos casos analisados, seguido pelo HPV18 (19%) e HPV45 (7%) (Lagheden *et al.*, 2018).

Assim como os demais vírus oncogênicos, o HPV é capaz de inibir, por meio dos oncogenes, as principais vias de supressão tumoral que as células possuem. Eles permitem a degradação, desse modo, da p53 e da proteína retinoblastoma,

as quais seriam fundamentais na indução do processo de apoptose das células cervicais danificadas. Com isso, há um aumento do acúmulo de mutações e da capacidade proliferativa do HPV, que infectará novas células (Chen *et al.*, 2018). Ademais, no processo oncogênico, a concentração de adenosina atinge níveis altos, o que estimularia a vasculogênese e promoveria a infiltração de células tumorais no tecido do colo uterino (Maldonado *et al.*, 2012).

Durante a carcinogênese, ocorrerá na zona de transformação – local onde mais de 90% das infecções desenvolvem-se – a substituição do epitélio colunar pelo epitélio escamoso em um processo chamado metaplasia escamosa (Deng *et al.*, 2018). Os tumores que se proliferam na porção escamosa são os carcinomas, que correspondem a 80-90% dos casos. A princípio, são assintomáticos, mas, no decorrer da patologia, podem causar sangramento, dor na região pélvica e dor após relação sexual. Os adenocarcinomas, por sua vez, são tumores que atingem células glandulares da endocérvix, promovendo um rápido crescimento celular (Brianti; Flammineis; Mercuri, 2017).

Dentre os principais fatores que aumentam o risco do desenvolvimento do CCU, destacam-se a utilização de contraceptivo oral por longo período, o número elevado de parceiros sexuais e o hábito de fumar (Su *et al.*, 2018). A primeira medida profilática do CCU é a vacinação (Schiffman *et al.*, 2016). A vacina contra o HPV é composta por proteínas recombinantes presentes nos capsídeos virais (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015). Atualmente, existem três tipos de vacina, dos quais a bivalente Cervarix protege contra o HPV16 e o HPV18, e a tetravalente Gardasil também fornece proteção contra o HPV6 e o HPV11 – responsáveis pelo condiloma acuminado. A nonavalente Gardasil9, por sua vez, é eficaz contra as cepas anteriormente citadas e outros HPVs carcinogênicos: 31, 33, 45, 52 e 58 (Harper; Demars, 2017).

Outra profilaxia adotada é o exame citológico, conhecido popularmente como Papanicolau, que realiza o rastreamento de possíveis displasias das células cervicais (Lagheden *et al.*, 2018). Dentre os benefícios desse exame, está a identificação precoce da lesão intraepitelial, minimizando a mortalidade do CCU. Para diagnosticar a infecção, também há a possibilidade de realizar o PCR – reação em cadeia da polimerase – e exame de detecção do DNA viral (Schiffman *et al.*, 2016).

Caso haja a confirmação da infecção, outros exames podem ser indicados, como histológico (padrão ouro), colposcopia, inspeção visual, expressão da p16, captura híbrida e marcadores de metilação (Schiffman *et al.*, 2016). O tratamento

dependerá do grau de displasia apresentado pela lesão intraepitelial, cuja classificação e nomenclatura dependerá do sistema utilizado (Quadro 1). Desse modo, são tratamentos disponíveis a ablação, por meio de crioterapia e laser, e a excisão, através de cirurgia de alta frequência e conização (Wang; Huang; Zhang, 2018).

Quadro 1. Sistema de Nomenclatura das Lesões Intraepiteliais

Classificação Citológica		Classificação Histológica	Classificação Molecular
Papanicolau	Bethesda	NIC	-
I	Negativo para lesão intraepitelial e malignidade	Normal	Cérvix normal
II	-	Células escamosas atípicas de significância indeterminada	-
III	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau	NIC I	Infecção pelo HPV
	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau	NIC II	Pré-câncer
IV		NIC III	
V	Câncer	Câncer	Câncer

Fonte: SCHIFFMAN *et al.*, 2016.

O câncer de colo uterino em seu estágio precoce é geralmente assintomático. No estágio avançado, entretanto, a paciente pode apresentar sangramento vaginal, ciclo menstrual irregular e dor abaixo do ventre (Dos Reis *et al.*, 2011). O tratamento do CCU depende do grau de estadiamento, que se fundamenta na Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (Quadro 2) (Matsuo *et al.*, 2019). Dessa forma, são possibilidades a histerectomia, quimioterapia, radioterapia, utilização de antiangiogênicos (como o fármaco bevacizumab) e cirurgia (Schiffman *et al.*, 2016).

Quadro 2 – Sistema de Estadiamento do Câncer de Colo Uterino

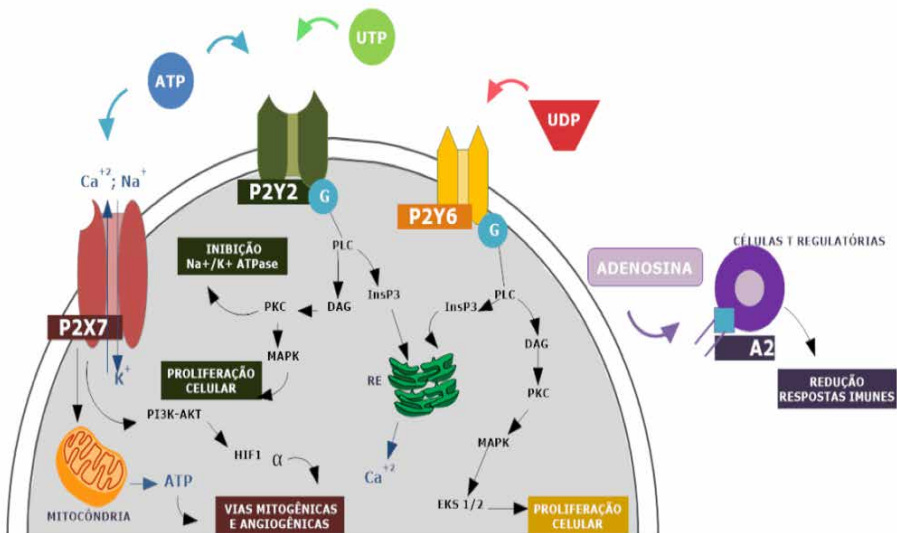
Estádio 0	NIC III (carcinoma in situ)
Estádio I	Carcinoma confinado ao colo uterino
Estádio IA	Invasão estromal de no máximo 5 mm de profundidade e 7 mm de extensão
Estádio IA1	Invasão estromal de 3 mm com, no máximo, 7 mm de extensão
Estádio IA2	Invasão estromal de 3 a 5 mm com, no máximo, 7 mm de extensão
Estádio IB	Lesão clínica confinada ao colo uterino
Estádio IB1	Lesão clínica <2 cm
Estádio IB2	Lesão clínica de 2 a 3.9 cm
Estádio IB3	Lesão clínica ≥4 cm
Estádio II	Envolvimento do terço superior e médio da vagina ou infiltração no paramétrio, não chegando à parede pélvica
Estádio IIA	Envolvimento da vagina, sem evidência de envolvimento parametrial
Estádio IIA1	Lesão clínica <4 cm
Estádio IIA2	Lesão clínica >4 cm
Estádio IIB	Infiltração do paramétrio não chegando à parede pélvica
Estádio III	Envolvimento do terço inferior da vagina ou infiltração do paramétrio até a parede pélvica
Estádio IIIA	Envolvimento do terço inferior da vagina, não chegando à parede pélvica
Estádio IIIB	Extensão parametrial até a parede pélvica
Estádio IIIC1	Metástase em linfonodo pélvico
Estádio IIIC2	Metástase em linfonodo para-aórtico
Estádio IV	Extensão além do trato genital
Estádio IVA	Envolvimento da mucosa da bexiga ou reto
Estádio IVB	Metástase à distância

Fonte: Dos Reis *et al.*, 2011 (adaptado).

Sistema Purinérgico e Câncer de Colo Uterino

O processo de crescimento, progressão e invasão de células cancerosas no organismo envolve uma sucessão de eventos que dizem respeito: à proliferação celular rápida e desordenada; à falha nos mecanismos que controlam a morte celular programada; ao aumento da angiogênese; e à capacidade de evitar que

células anormais sejam percebidas pelo sistema imune (Gao; Dong; Zhang, 2014). Recentemente, o sistema purinérgico vem sendo associado como uma via de sinalização importante no que diz respeito à progressão de células tumorais (Di Virgilio *et al.*, 2018), isso porque, em ambientes tumorais existe um desbalanço nos nucleotídeos ATP/ADP, AMP e adenosina e a superexpressão ou, em alguns casos, a diminuição da expressão de receptores P2 (Ferrari; Malavasi; Antonioli, 2017). Em relação ao microambiente tumoral do CCU, ele se caracteriza por ser rico em ATP e adenosina, o que sugere que a sinalização e a via purinérgica desempenham um importante papel em relações a mecanismos que controlam o crescimento e morte celular no câncer (Figura 1) (Mello *et al.*, 2014).

Figura 1: Ilustração da visão geral do sistema purinérgico e sua sinalização de uma célula de CCU

Fonte: autores (2019).

* Mecanismos diferentes são acionados quando estimulados pelos distintos nucleotídeos no microambiente tumoral do CCU. O receptor P2X7, ao ser ativado, promove um aumento na produção de ATP intracelular e, pela via PI3K-AKT, através da sinalização dependente de HIF1α, aciona vias mitogênicas e angiogênicas, estimulando a progressão tumoral.

Os receptores do tipo P2Y são acoplados à proteína G e ativam a via da PLC. A PLC leva a formação de InsP3, que, por sua vez, leva a liberação de Ca+2 intracelular – com maior ou menos intensidade, dependendo do nucleotídeo e do receptor estimulado. A via da PLC, ao ser ativada, também provoca a geração de DAG, que, por sua vez, é um ativador de PKCs. Ao ser ativado, o receptor P2Y2, por meio da ativação de PKCs, participa da inibição da Na+/K+ ATPase e, através da via MAPK, no aumento da proliferação celular, enquanto o receptor P2Y6, via PLC, por meio da via MAPK/EK1,2, participa igualmente de processos que levam à proliferação celular.

A adenosina, também presente em altas quantidades no microambiente tumoral, leva a ativação do receptor A2A em células de linfócitos T, o que promove a diminuição da proliferação, ativação e da função efetora dessas células.

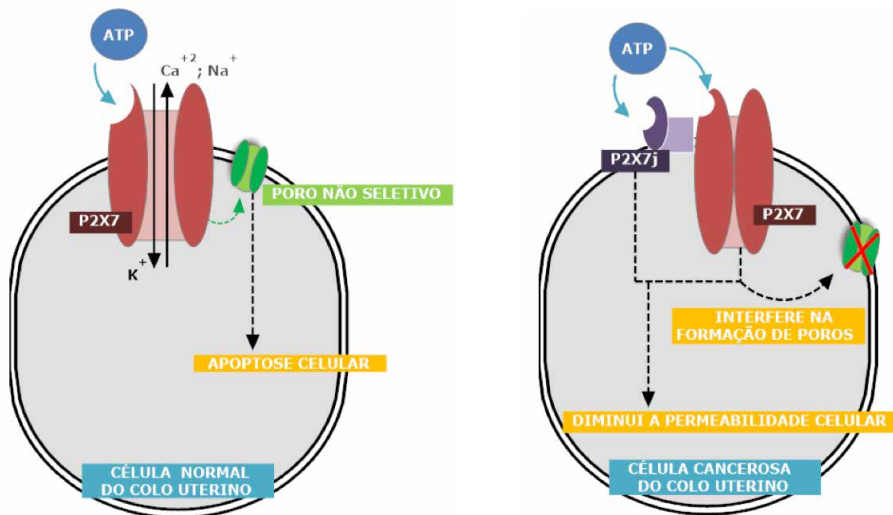
No CCU, a infecção por HPV e a perturbação de mecanismos que envolvem a diferenciação e apoptose celular estão relacionadas com a progressão tumoral (Schiffman *et al.*, 2011). Ao longo do ciclo de replicação viral e do processo de diferenciação celular, ocorrem alterações intraepiteliais, que, posteriormente, podem se caracterizar como um processo invasor (Schiffman *et al.*, 2016). Essas lesões percursoras – as NICs – são classificadas em diferentes graus cito-histopatológicos baseados na severidade de anomalias celulares conhecidos como NICI, NICII e NICIII e se caracterizam como um estágio pré-câncer (Maldonado *et al.*, 2012). Em um estudo clínico realizado em plaquetas de pacientes, Maldonado *et al.* (2012) demonstraram que o balanço dos componentes da via purinérgica sofre alterações nos diferentes graus de NICs e no estágio de CCU propriamente dito. Verificou-se que o ADP e o AMP são mais sensíveis ao estágio de câncer quando comparados ao ATP, uma vez que as taxas de hidrólise desses dois nucleotídeos sofreram maiores alterações entre os grupos observados. Quanto ao ATP, resultados mostraram que houve uma diminuição gradual da atividade de hidrólise deste nucleotídeo entre os grupos de NICs até o estágio de câncer.

A baixa atividade enzimática da ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1 (NTPDase1), em função da diminuição da taxa de hidrólise de ATP entre os grupos analisados, segundo os autores, funcionaria como uma estratégia de defesa contra uma agregação plaquetária descontrolada, à medida que o ADP – que é o produto imediato do ATP – atua como facilitador desta agregação (Maldonado *et al.*, 2012). No entanto, apesar das conclusões dos autores de que o ATP funcionaria como um inibidor da interação do ADP com receptores presentes

nas plaquetas, diversos estudos demonstraram que o ATP também desempenha um papel de agente agregador plaquetário (Nurden, 2007). Dessa forma, investigações adicionais tornam-se necessárias para esclarecer se declínio da hidrólise de ATP entre os grupos de NICs até o estágio de câncer, observadas no estudo clínico realizado por Maldonado *et al.* (2012), estão ou não relacionados com um mecanismo de defesa celular.

A presença de ATP extracelular – abundante no microambiente tumoral (Di Virgilio *et al.*, 2018) – também ativa o receptor purinérgico P2X7, o que culmina, inicialmente, no fluxo de íons Ca^{+2}, K^{+} e Na^{+}. Situações em que o ATP extracelular interage com o P2X7 por longos períodos acarretam o surgimento de poros não seletivos e irreversíveis. Tais poros, possivelmente, levam a apoptose das células cervicais (Pevarello *et al.*, 2017). Esse importante mecanismo celular, que se inicia a partir do estímulo de ATP extracelular, e é mediado pelo P2X7, ativa a 9-caspase mitocondrial por meio de uma cascata de sinalização (Wang *et al.*, 2004). Além disso, ao ser ativado, o receptor P2X7 induz um aumento na concentração de Ca^{+2} mitocondrial, o que leva a uma maior geração de ATP intracelular e de metabólitos para a síntese de estruturas celulares – por meio do aumento da fosforilação oxidativa. A via PI3K-AKT, dependente da ativação de P2X7, atua na indução de quadros de fornecimento inadequado de oxigênio às células tumorais a partir da sinalização dependente de fator induzível por hipóxia-1α (HIF1α) que estimula vias mitogênicas e angiogênicas. Tais eventos favorecem a composição bioquímica do microambiente tumoral e a progressão de células cancerosas, como ilustra a Figura 1 (Di Virgilio *et al.*, 2018).

Células tumorais do colo uterino apresentam, ainda, uma variante do receptor P2X7, o qual é chamado de P2X7j, uma proteína de 258 aminoácidos que se caracteriza por não apresentar a parte C-terminal intracelular e não possuir o segundo domínio transmembrana, bem como o terço distal da alça extracelular, que estão presentes na estrutura do receptor P2X7 (Feng *et al.*, 2006). Essa variante P2X7j, ao interagir com P2X7, não só prejudica a formação dos poros e perturba a permeabilidade das membranas celulares, como também afeta a indução da morte celular, que é mediada pelo P2X7, como mostra a Figura 2 (Roger; Pelegrin, 2011). Acredita-se, assim, que a expressão de P2X7j em células tumorais cervicais do trato genital feminino favorece o crescimento celular desordenado, pois evita a apoptose (Feng *et al.*, 2006).

Figura 2: Ilustração esquemática da interação do ATP extracelular com o receptor P2X7 e sua variante P2X7j

Fonte: autores (2019).

* O P2X7 é expresso tanto em células normais, quanto em células cancerosas de CCU. No entanto, em condições normais, atua na permeabilidade celular e na formação de poros não seletivos, interferindo na permeabilidade celular e desencadeando processos que levam à apoptose celular. Células cancerosas do colo uterino, por sua vez, expressam uma variante P2X7j, que interfere na formação de poros não seletivos, diminuindo a permeabilidade celular e na morte celular, facilitando a proliferação generalizada de células.

O ATP extracelular pode, ainda, ativar alguns receptores purinérgicos P2Y, como P2Y2 e P2Y11, que, diferentemente de receptores P2X, são metabotrópicos e estão acoplados à proteína G (North; Barnard, 1997). Em estudo conduzido em linhagens de células cancerosas do colo uterino (CXT *cell lines*), constatou-se que a interação desse nucleotídeo com receptores P2Y específicos permeabiliza a membrana plasmática destes tipos celulares a substâncias citotóxicas catiônicas poliatômicas – como a Hoechst 33258 (Pibenzimol). A hipótese inicial do estudo era que o Hoechst 33258 adentraria nas células por meio dos receptores P2X7, que são permeáveis a substâncias catiônicas de maior dimensão. Contudo,

evidenciou-se que, em células cancerosas do colo uterino, citotoxinas catiônicas não são transferidas ao meio intracelular por esse processo (Bukhari *et al.*, 2015), dado que, como previamente exposto, células tumorais cervicais apresentam uma variante P2X7j que interage com o receptor P2X7 e interfere na permeabilidade da membrana celular (Di Virgilio *et al.*, 2018). No entanto, essas substâncias ainda conseguem penetrar a membrana plasmática das células epiteliais cervicais cancerosas a partir dos receptores P2Y ativados pelo ATP extracelular (Bukhari *et al.*, 2015).

Receptores P2Y acoplados à proteína G ativam a via fosfolipase C (PLC), responsável por formar inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3) (Von Kügelgen; Wetter, 2000) e, por meio da formação de diacilglicerol (DAG), um ativador endógeno de proteínas quinases C (PKCs) (Erb; Weisman, 2012; Muscella *et al.*, 2003a). A formação de InsP3, através da ativação da PLC, acontece a partir da ligação de nucleotídeos extracelulares com receptores P2Y, os quais, subsequentemente, de maneira mais ou menos intensa, aumentam a concentração de cálcio citoplasmático de células adjacentes e não adjacentes àquelas inicialmente estimuladas (Okuda; Furuya; Kiyohara, 2003; Locovei; Wang; Dahl, 2006).

Células HeLa – primeira linhagem de células cultivadas em laboratório e originadas de um adenocarcinoma do colo uterino (Landecker, 2000) – apresentam oscilações na concentração de íons Ca^{+2} intracelular quando submetidas a determinadas concentrações de ATP, UTP, UDP e ADP. Essas variações na concentração expressam-se com intensidades diferentes em relação ao tipo de nucleotídeo e dosagem utilizados (Okuda; Furuya; Kiyohara, 2003). Os nucleotídeos ATP e UTP, por exemplo, apresentaram potencial semelhante na promoção do íon Ca^{+2}, por meio da ativação do P2Y2 (Muscella *et al.*, 2003b), além de também possuírem efeito inibitório na atividade da Na+/K+ ATPase via ativação de PKC-α, -β e ε. (Muscella *et al.*, 2003a). A Na^+/K^+ ATPase participa, fundamentalmente, na regulação do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática; no entanto, estudos recentes vêm associando-a também como um importante fator de iniciação, crescimento e desenvolvimento de células cancerosas através de inúmeras vias regulatória de manutenção e morte celular (Durlacher *et al.*, 2015). A inibição da atividade da Na^+/K^+ ATPase pelo ATP e UTP, via P2Y2, consequentemente, corrobora a progressão tumoral (Blok *et al.*, 1999). Ademais, quando ativado, o receptor P2Y2 participa do processo de proliferação celular por meio

de vias que envolvem proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), como ilustra a Figura 1 (Muscella *et al.*, 2003b).

Ao longo do processo de proliferação, verifica-se o aumento na expressão dos receptores P2Y4 e P2Y6 (Burnstock, 2017), ativados, respectivamente, por UTP e UDP (Von Kügelgen; Wetter, 2000). No que se refere aos receptores P2Y6, presentes em células HeLa, eles possuem sua ativação por UDP ou por moléculas análogas à timina 5'-O-monofosforotioato (Gendaszewska-Darmach; Szustak, 2016) e estão relacionados com o estímulo à proliferação celular envolvendo vias de fosforilação de quinases reguladas por sinais extracelulares (EKS) 1 e 2, através da via MAPK/EKS e a expressão da proteína c-Fos, como se verifica na Figura 1 (Muscella *et al.*, 2004).

A hipóxia decorrente do crescimento de células tumorais no colo uterino, em consequência da vascularização inadequada, promove a degradação dos nucleotídeos de adenina, resultando na liberação de adenosina extracelular em excesso (Merighi *et al.*, 2003). Com isso, há o aumento da atividade das enzimas pirofosfatase/fofodiesterase (E-NPP), adenosina desaminase (ADA) (Beckenkamp *et al.*, 2014), NTPDase1 e ecto-5'-nucleotidase (Bahreyni *et al.*, 2018). Como consequência dessa via adrenérgica, forma-se um microambiente imunossupressor favorável ao crescimento do tumoral (Rocha-García *et al.*, 2019).

A concentração elevada de adenosina, dessa forma, promove a ativação do receptor A2A em linfócitos T regulatórios (Treg cells), fator que ocasiona a diminuição da proliferação, ativação e função efetora dos linfócitos T citotóxicos, como demonstra a Figura 1 (De Lourdes Mora-García *et al.*, 2016). Nesse sentido, Bahreyni *et al.* (2018) descrevem que a ativação de moléculas adenosinérgicas, incluindo as enzimas NTPDase1, ecto-5'-nucleotidase e os receptores A2A e A2B, tem ação redutora nas respostas imunes do organismo ao longo do desenvolvimento do CCU. O comprometimento da resposta imune ocorre, principalmente, devido à superexpressão da interleucina 10 (IL-10) e da baixa regulação do sistema de antígenos leucocitários humanos de classe I (HLAI) (Bahreyni *et al.*, 2018). Além disso, ao interagir com esses dois receptores, a adenosina extracelular induz a produção do fator de crescimento transformador-β (TGF-β) (Rocha-García *et al.*, 2018), que também suprime as respostas imunes antitumorais (Karunagaran; Jinesh, 2008).

Adenosina extracelular em altas concentrações também está associada à indução da apoptose de células de uma variedade de células cancerosas (Bahreyni

et al., 2018). Em estudo realizado em culturas de células SheLa, linhagem celular de carcinoma cervical humano infectada por HPV-16, constatou-se que tais células, quando expostas a quantidades expressivas de AMP extracelular – que não é ligante de nenhum tipo de receptor purinérgico P2 – apresentam a capacidade de promover morte celular. Isso porque a AMP, posteriormente, seria degradado a adenosina pela ecto-5'-nucleotidase. Tal fato, portanto, demonstra o importante papel desempenhado pela adenosina na indução da morte celular de células cancerosas do colo uterino (Mello *et al.*, 2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sob os aspectos gerais do câncer de colo uterino, conclui-se que a subjetividade do sistema de classificação das lesões intraepiteliais é um obstáculo na definição de tratamentos adequados, sendo que a particularidade da paciente também deve ser levada em consideração. Ademais, há a importância de a vacina atuar como forma de prevenir, além da infecção pelo HPV, a persistência desta infecção e uma possível evolução para a lesão intraepitelial e, consequentemente, ao processo carcinogênico.

Além disso, em relação à interação do CCU com o sistema purinérgico, células tumorais cervicais caracterizam-se por apresentar uma rede purinérgica anormal, à medida que expressam uma maior atividade de ectoenzimas, como a E-NPP, ADA, NTPDase1 e a ecto-5'-nucleotidase, e a superexpressão ou não de receptores específicos. Tal fato ocorre devido às altas concentrações de nucleotídeos extracelulares no microambiente tumoral. Esses nucleotídeos (purinas e pirimidinas) agem e interferem na regulação, proliferação, diferenciação e apoptose de células cancerígenas do colo uterino, por meio de diferentes subtipos de receptores P2. Isso posto, é importante ressaltar que o conhecimento da sinalização purinérgica em células tumorais do CCU pode contribuir para futuros tratamentos terapêuticos e estudos que auxiliem na melhor compreensão do avanço e da proliferação da doença.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunidade aos Tumores. *In*: Imunologia Celular e Molecular. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 887-911.

BAHREYNI, A. *et al.* Adenosine: An endogenous mediator in the pathogenesis of gynecological cancer. Journal of Cellular Physiology, v. 233, n. 4, p. 2715-2722, 2018.

BECKENKAMP, A. *et al.* Ectonucleotidase expression profile and activity in human cervical cancer cell lines. Biochemistry and Cell Biology, v. 92, n. 2, p. 95-104, 2014.

BLOK, L. J. *et al.* Regulation of expression of Na+,K+-ATPase in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer. British Journal of Cancer, v. 81, n. 1, p. 28-36, 1999.

BOUVARD, V. *et al.* A review of human carcinogens – Part B: biological agents. The Lancet Oncology, v. 10, n. 4, p. 321-322, 2009.

BRIANTI, P.; FLAMMINEIS, E. D.; MERCURI, S. R. Review of HPV: related diseases and cancers. New Microbiologica, v. 40, n. 2, p. 6, 2017.

BUKHARI, M. *et al.* Selective permeabilization of cervical cancer cells to an ionic DNA-binding cytotoxin by activation of P2Y receptors. FEBS Letters, v. 589, n. 13, p. 1498-1504, 2015.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. Frontiers in Pharmacology, v. 8, 2017.

CAMPION, M.; CANFELL, K. Cervical Cancer Screening and Preinvasive Disease. *In*: BEREK, J.; HACKER, N. F. (ed.). Gynecologic Oncology. 6. ed. Filadélfia: Wolters Kluwer, 2015. p. 242-325.

CHEN, L. *et al.* Integrated analysis of HPV-mediated immune alterations in cervical cancer. Gynecologic Oncology, v. 149, n. 2, p. 248-255, 2018.

DE LOURDES MORA-GARCÍA, M. *et al.* Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions. Journal of Translational Medicine, v. 14, n. 1, 2016.

DENG, H. *et al.* HPV16-Immortalized Cells from Human Transformation Zone and Endocervix are More Dysplastic than Ectocervical Cells in Organotypic Culture. Scientific Reports, v. 8, n. 1, p. 2-13, 2018.

DI VIRGILIO, F. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. Cancer Research, v. 72, n. 21, p. 5441-5447, 2012.

DI VIRGILIO, F. *et al.* Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. Nature Reviews Cancer, v. 18, n. 10, p. 601-618, out. 2018.

DOS REIS, R. *et al.* Carcinoma de Colo Uterino. *In*: FREITAS, F. *et al.* (ed.). Rotinas em Ginecologia. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2011. p. 417-428.

DURLACHER, C. T. *et al.* Targeting Na+/K+-ATPase in cancer treatment. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, v. 42, n. 5, p. 427-443, 2015.

ERB, L.; WEISMAN, G. A. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. Wiley

Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling, v. 1, n. 6, p. 789-803, 2012.

FENG, Y.-H. *et al.* A truncated P2X7 Receptor Variant (P2X7-j) Endogenously Expressed in Cervical Cancer Cells Antagonizes the Full-Length P2X7 Receptor Through Hetero-Oligomerization. Journal of Biological Chemistry, v. 281, n. 25, p. 17228-17237, 2006.

FERRARI, D.; MALAVASI, F.; ANTONIOLI, L. A Purinergic Trail for Metastases. Trends in Pharmacological Sciences, v. 38, n. 3, p. 277-290, 2017.

GAO, Z.; DONG, K.; ZHANG, H. The Roles of CD73 in Cancer. BioMed Research International, v. 2014, p. 1-9, 2014.

GENDASZEWSKA-DARMACH, E.; SZUSTAK, M. Thymidine 5'-O-monophosphorothioate induces HeLa cell migration by activation of the P2Y6 receptor. Purinergic Signalling, v. 12, n. 2, p. 199-209, 2016.

GLOBOCAN. Cancer Today, 2018. Disponível em: goo.gl/bAF5o5 Acesso em: 20 jan. 2019.

HARPER, D. M.; DEMARS, L. R. HPV vaccines – A review of the first decade. Gynecologic Oncology, v. 146, n. 1, p. 196-204, 2017.

KARUNAGARAN, D.; JINESH, G. TGF-β, Smads and Cervical Cancer. *In*: JAKOWLEW, S. B. (ed.). Cancer Drug Discovery and Development: Growth Factor-β in Cancer Therapy. Cancer Treatment and Therapy. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. v. 2, p. 33-49.

KRUMP, N. A.; YOU, J. Molecular mechanisms of viral oncogenesis in humans. Nature Reviews Microbiology, v. 16, n. 11, p. 684-698, 2018.

LAGHEDEN, C. *et al.* Nationwide comprehensive human papillomavirus (HPV) genotyping of invasive cervical cancer. British Journal of Cancer, v. 118, n. 10, p. 1377-1381, 2018.

LANDECKER, H. Immortality, in Vitro: A History of the HeLa Cell Line Creator. *In*: BRODWIN, P. E. (ed.). Biotechnology and Culture: Bodies, Anxieties, Ethics. Theories of Contemporary Culture. Indiana: Indiana University Press, 2000.

LEE, S. G. *et al.* The effect of adenosine 5'-triphosphate on calcium mobilization and cell proliferation in cervical cancer cells. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v. 127, n. 1, p. 110-114, 2006.

LOCOVEI, S.; WANG, J.; DAHL, G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. FEBS Letters, v. 580, p. 239-244, 2006.

MALDONADO, P. A. *et al.* Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 66, n. 1, p. 6-11, 2012.

MATSUO, K. *et al.* Validation of the 2018 FIGO cervical cancer staging system. Gynecologic Oncology, v. 152, n. 1, p. 87-93, 2019.

MELLO, P. DE A. *et al.* Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. Molecular Biology of the Cell, v. 25, n. 19, p. 2905-2918, 2014.

MERIGHI, S. *et al.* A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. Pharmacology & Therapeutics, v. 100, n. 1, p. 31-48, 2003.

MUSCELLA, A. *et al.* Activation of P2Y2 purinoceptor inhibits the activity of the Na+/K+-ATPase in HeLa cells. Cellular Signalling, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2003a.

MUSCELLA, A. *et al.* Activation of P2Y2 receptor induces c-FOS protein through a pathway involving mitogen-activated protein kinases and phosphoinositide 3-kinases in HeLa cells. Journal of Cellular Physiology, v. 195, n. 2, p. 234-240, 2003b.

MUSCELLA, A. *et al.* Differential signalling of purinoceptors in HeLa cells through the extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C pathways. Journal of Cellular Physiology, v. 200, n. 3, p. 428-439, 2004.

NORTH, R. A.; BARNARD, E. A. Nucleotide receptors. Current Opinion in Neurobiology, v. 7, p. 346-357, 1997.

NURDEN, A. T. Does ATP act through P2X 1 receptors to regulate platelet activation and thrombus formation?. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 5, n. 5, p. 907-909, 2007.

OKUDA, A.; FURUYA, K.; KIYOHARA, T. ATP-induced calcium oscillations and change of P2Y subtypes with culture conditions in HeLa cells. Cell Biochemistry and Function, v. 21, n. 1, p. 61-68, 2003. PEVARELLO, P. *et al.* P2X7 antagonists for CNS indications: recent patent disclosures. Pharmaceutical Patent Analyst, v. 6, n. 2, p. 61-76, 2017.

GARCÍA-ROCHA, Rosario *et al.* Cervical cancer cells produce TGF-β1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF-β1. Cytokine, v. 118, p. 71-79, 2019.

ROGER, S.; PELEGRIN, P. P2X7 receptor antagonism in the treatment of cancers. Expert Opinion on Investigational Drugs, v. 20, n. 7, p. 875–880, 2011.

SCHIFFMAN, M. *et al.* Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. Journal of the National Cancer Institute, v. 103, n. 5, p. 368-383, 2011.

SCHIFFMAN, M. *et al.* Carcinogenic human papillomavirus infection. Nature Reviews Disease Primers, v. 2, p. 1-20, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019: Cancer Statistics, 2019. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 69, n. 1, p. 7-34, 2019.

SU, B. *et al.* The relation of passive smoking with cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. Medicine, v. 97, n. 46, p. 1-7, 2018.

VON KÜGELGEN, I.; WETTER, A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, v. 362, p. 310-323, 2000.

WANG, Q. *et al.* P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells. American Journal of Physiology-Cell Physiology, v. 287, n. 5, p. 1349–1358, 2004.

WANG, X.; HUANG, X.; ZHANG, Y. Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. Frontiers in Microbiology, v. 9, p. 1-39, 2018.

ZHANG, L. *et al.* Genomic characterization of cervical cancer based on human papillomavirus status. Gynecologic Oncology, p. 1-9, 2018.

CÂNCER COLORRETAL E SISTEMA PURINÉRGICO

João Paulo Dal Magro Mocellin
Matheus Pelinski da Silveira
Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

INTRODUÇÃO

Câncer colorretal (CCR) é uma definição genérica que pode ser atribuída a diversas neoplasias localizadas no cólon ou no reto, partes do intestino grosso responsáveis pela absorção de grande percentual de água proveniente da alimentação (Brenner, Kloor, Pox, 2014).

Mundialmente, o CCR representa o terceiro tipo de câncer mais incidente e o segundo mais mortal, com mais de 1,8 milhão de casos novos em 2018, e 881 mil mortes estimadas para o mesmo ano. As taxas de incidência tendem a ser mais altas em países desenvolvidos, apesar dos maiores números serem registrados na Coréia do Sul para homens, e na Macedônia para mulheres (Bray *et al.*, 2018).

No Brasil, para os anos de 2018 e 2019, estimou-se 36.360 novos casos de CCR para homens e mulheres, representando cerca de 6,24% de todos os novos casos de neoplasias, sendo o terceiro mais incidente em homens e o segundo em mulheres, excetuando-se as neoplasias de pele não-melanoma (Brasil, 2018).

Sendo assim, levando-se em consideração a relevância epidemiológica do CCR e de outros cânceres, a busca por novas modalidades de tratamento que sejam mais eficazes é constante. Fala-se cada vez mais sobre terapias-alvo, mais específicas e com baixo perfil de efeitos colaterais. Nesse contexto, o sistema

purinérgico é um mundo a ser explorado, com suas particularidades para cada tipo de neoplasia (Burnstock, Di Virgilio, 2013).

Câncer Colorretal (CCR): fatores de risco e fatores de proteção

No Brasil, infelizmente, tanto as taxas de incidência do CCR como de mortalidade apresentam tendência ao crescimento, fato que está diretamente relacionado ao aumento nos níveis de obesidade, bem como nas mudanças no estilo de vida da população em geral (Bray *et al.*, 2018).

Dietas baseadas em alimentos processados ou carne vermelha sabidamente contribuem para o aumento de incidência, assim como o sedentarismo, diabetes, tabagismo, consumo excessivo de bebidas alcoólicas e a presença de doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn, retocolite ulcerativa) (Chan, Giovannucci, 2010).

Sendo assim, através de uma dieta balanceada, rica em fibras e com preferência por proteína oriunda de carnes brancas, associada à prática de exercícios físicos a fim de eliminar o sedentarismo e a obesidade, é possível atuar de forma preventiva e menos favorável ao desenvolvimento do CCR. Existe, também, uma relação entre o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (marcadamente o ácido acetilsalicílico) e a diminuição da incidência e mortalidade por CCR, principalmente após longos períodos de administração do fármaco (cerca de 5 anos) (Chan, Giovannucci, 2010; Rothwell *et al.*, 2010; Kunzmann *et al.*, 2015).

Diagnóstico e estratégias de rastreamento

O diagnóstico de CCR baseia-se na realização de biópsia, através do exame de colonoscopia, que é o padrão ouro para o rastreio. Nesse exame, toda a extensão do intestino grosso é avaliada por uma câmera inserida através do orifício anal. Caso o médico encontre alguma lesão polipoide (pré-maligna ou não), é possível, através de um conduto anexo ao da câmera, manipular pinças a fim de realizar a remoção do pólipo, possibilitando a análise citopatológica. Entretanto, aproximadamente 10% de todas as lesões pré-malignas no intestino grosso não se apresentam no formato de pólipo, mas sim como lesões planas ou depressões

na mucosa intestinal. Esses tipos mais raros de lesões pré-malignas demandam mais atenção do médico para serem identificadas, além de estarem ligeiramente mais relacionadas à progressão para adenocarcinoma (Soetikno *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2018).

O surgimento da neoplasia maligna depende da evolução de uma lesão pré-cancerosa no decorrer de 7 a 10 anos (através de uma sequência que será explicitada a seguir), e, portanto, existem estratégias muito eficazes que podem ser utilizadas a fim de prevenir o surgimento do CCR. Há tempo para detectar as lesões em estágio inicial, desde que o rastreio seja corretamente efetuado. O Ministério da Saúde recomenda que, a partir dos 50 anos, sejam realizados anualmente ou bianualmente testes de sangue oculto nas fezes. Caso esses testes sejam reagentes, então, deve-se realizar uma colonoscopia. Até a metade de 2018, a Sociedade Americana de Câncer também recomendava o início do rastreio para CCR aos 50 anos, porém, mudanças no estilo de vida da população, levando ao aumento da prevalência desse tipo de câncer em pessoas mais jovens, fizeram com que as recomendações fossem revistas. Atualmente, a recomendação é a realização da pesquisa anual de sangue oculto nas fezes e colonoscopias para rastreio a cada 5 anos, a partir dos 45 anos de idade. Em indivíduos com história familiar de CCR, deve-se considerar a idade na qual o paciente teve câncer e subtrair 10 anos para iniciar o rastreio. Por exemplo, caso a mãe de determinado paciente teve CCR aos 50 anos de idade, ele deve iniciar o rastreio aos 40 anos (Brasil, 2010; Wolf *et al.*, 2018).

O rastreio para CCR é ainda mais importante quando consideramos a natureza silenciosa da doença. Em estágios iniciais, incluindo fases pré-malignas, não existem sintomas, sendo que as manifestações clínicas acontecem devido ao estreitamento da luz intestinal. O estreitamento se dá por conta do crescimento tumoral, podendo gerar períodos de constipação alternados com diarreia. Também é possível que ocorram sangramentos intestinais, que podem ser visíveis ou microscópicos. No decorrer do capítulo, apresentaremos a influência da localização do tumor na sintomatologia clínica (Majumdar, Fletcher, Evans, 1999).

Considerando que o CCR é uma doença silenciosa no início, o que leva à negligencia do seu rastreio, alguns pacientes apenas são diagnosticados quando a doença já está disseminada. Para avaliar o acometimento da doença, utiliza-se o método TNM de estadiamento, assim como em diversas outras neoplasias sólidas. O TNM avalia o tamanho do tumor (T), o envolvimento linfonodal

(N) e a presença de metástases à distância, e, com base nesses dados, estima um prognóstico. O principal fator determinante de piora no prognóstico é o envolvimento linfonodal, que sugere fortemente disseminação tumoral e consequente aumento no risco de metástases à distância. Quanto mais linfonodos acometidos por células neoplásicas, menor a sobrevida do paciente. Pacientes com doença localizada, sem acometimento linfonodal, chegam a quase 100% de sobrevida após 5 anos, enquanto pacientes com doença metastática apresentam cerca de 10% de sobrevida após o mesmo período de tempo (Brenner, Kloor, Pox, 2014).

Fisiopatologia

Grosseiramente, o CCR em cólon ascendente é diferente do CCR em cólon transverso e descendente em progressão para diferentes padrões morfológicos de invasão e expansão. No cólon ascendente, geralmente os tumores surgem como massas exofíticas polipoides ou fúngicas. Clinicamente, pode ser suspeito na ocorrência de anemia inexplicada por deficiência de ferro, a qual é causada por um sangramento oculto. Já os tumores dos cólons transverso e descendente são mais comumente anulares, produzindo lesões em "argola de guardanapo". Assim, ocorre estreitamento luminal, gerando sintomas de disfunção intestinal, como constipação, diarreia ou obstrução intestinal (Carraro et. al., 2001; Robbins, 2010; Katoh *et al.*, 2011). Apesar dessas diferenças, microscopicamente, os CCR dos cólons ascendente, transverso e descendente são semelhantes, tendo origem em adenomas ou displasias planas, bem como possuem um prognóstico similar quando locorregionais (Weiss *et al.*, 2011).

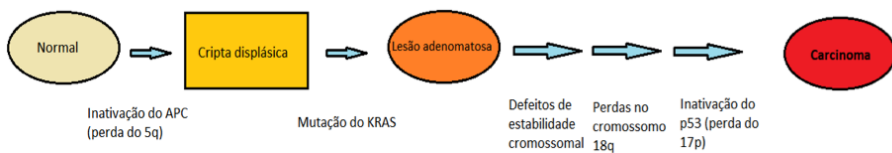
São dois os principais mecanismos pelo qual o CCR se forma: a partir da sequência adenoma-carcinoma (Figura 1), responsável por cerca de 80% dos casos de CCR; e deficiências no reparo *mismatch* de DNA (Robbins, 2010). Na sequência adenoma-carcinoma, formam-se pólipos adenomatosos no cólon quando mecanismos normais de regulação da renovação do epitélio são interrompidos. No intestino, as células superficiais que o revestem são continuamente esfoliadas e perdidas no lúmen, devido à apoptose, necessitando ser substituídas. No processo normal, essa proliferação ocorre exclusivamente na base da cripta. Assim, à medida que as células se movem em direção à superfície do lúmen, elas vão deixando de proliferar e se diferenciar terminalmente. Tal processo é prejudicado

com o crescimento dos adenomas, que se tornam displásicos e, eventualmente, atingem potencial invasivo (Zauber *et al.*, 2012; Øines *et al.*, 2017).

Na sequência adenoma-carcinoma, ocorrem mutações no gene da polipose adenomatosa coli (*APC*), regulador negativo e responsável pela degradação da β-catenina na via, proteína envolvida no processo de adesão celular. Nos adenomas, as cópias dos genes *APC* estão inativas ou por mutações ou por eventos epigenéticos. Assim, a β-catenina vai se acumulando no núcleo celular, ativando a transcrição de genes que promovem a sua proliferação. Adicionalmente, ocorrem mutações tardias no oncogene *Kirsten Rat Sarcoma* (KRAS), que promovem o crescimento e previnem apoptose (Robbins, 2010; Parreiras *et al.*, 2013).

O desenvolvimento da neoplasia também se relaciona com mutações em outros genes supressores tumorais, como os genes *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2* (SMAD2) e 4 (SMAD4), que são sinalizadores do fator de transformação de crescimento beta (TGF-β). Normalmente, essa sinalização inibe o ciclo celular, tornando o crescimento celular desenfreado com a sua perda. Outro supressor tumoral que, quando mutado, se relaciona com o CCR é o gene *TP53*, o qual codifica uma fosfoproteína nuclear importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução da apoptose (Cavalcanti Júnior, Klumb e Maia, 2002), encontrado em 70 a 80% dos casos, porém não encontrado em adenomas, sugerindo, assim, uma mutação tardia (Robbins, 2010).

Figura 1: Sequência adenoma-carcinoma

Normal
Cripta displásica
Lesão adenomatosa
Carcinoma
Inativação do APC (perda do 5q)
Mutação do KRAS
Defeitos de estabilidade cromossomal
Perdas no cromossomo 18q
Inativação do p53 (perda do 17p)

Fonte: Fearon (2011) – adaptada pelos autores (2019).

A segunda via envolve deficiências no reparo *mismatch* de DNA, gerando um acúmulo de mutações que recebem o nome de instabilidades microssatélite. Geralmente silenciosas, algumas mutações se localizam em regiões promotoras de genes envolvidos no crescimento celular, tal qual as regiões que codificam os genes *TGF-β* tipo II e a proteína pró-apoptótica X associada ao BCL-2 (BAX).

O *TGF-β* tem função inibidora do crescimento de células epiteliais colônicas, a qual é prejudicada pelas mutações que, associadas a perdas na proteína BAX, não conseguem impedir o crescimento tumoral (Robbins, 2010). Outras alterações encontradas quando se há defeito no reparo *mismatch* são mutações no proto-oncogene B-Raf (BRAF) e silenciamento de grupos distintos de genes pela hipermetilação de ilhas CpG (Noffsinger, 2009; Robbins, 2010).

Aspectos terapêuticos e a sinalização purinérgica

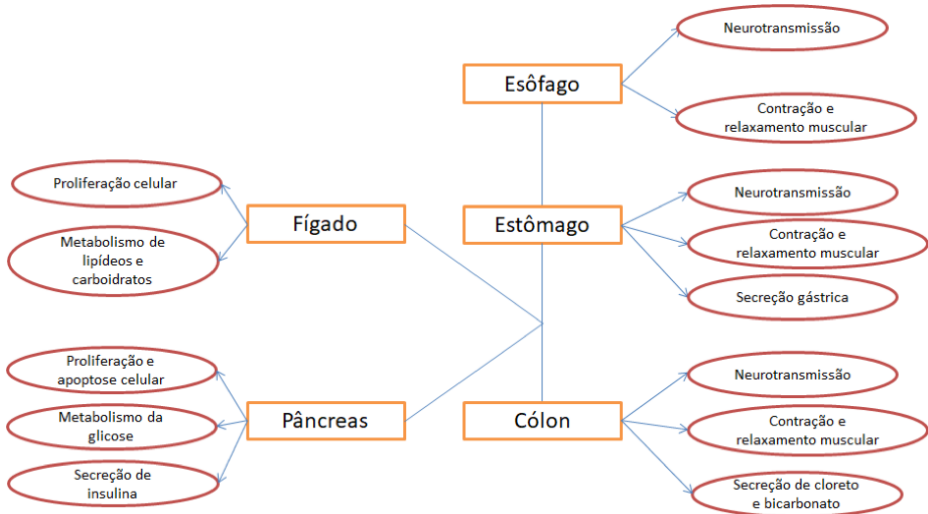
As estratégias de tratamento para o CCR dependem do estadiamento da doença. Tumores em estágio inicial são tratados, via de regra, com cirurgia, e a técnica cirúrgica a ser utilizada depende da localização do tumor. Em geral, é retirada uma porção do intestino grosso, com margens livres antes e adiante do tumor, podendo ser necessária a utilização de uma bolsa de colostomia. Tumores mais avançados, geralmente, recebem, além da cirurgia, ciclos de quimioterapia e radioterapia. No caso de metástases isoladas (hepáticas ou pulmonares) passíveis de ressecção, deve-se realizar a remoção cirúrgica do tumor primário e da metástase, somando-se à quimioterapia e/ou radioterapia. Se as metástases forem irressecáveis, a estratégia de tratamento passa a ser paliativa, baseada na realização de quimioterapia e/ou radioterapia, bem como em estratégias para melhorar a qualidade de vida do paciente (Brenner, Kloor, Pox, 2014).

Sendo assim, até pouco tempo atrás, a possibilidade de cura para os tumores sólidos (assim como o CCR) estava baseada na realização de procedimentos cirúrgicos, normalmente muito invasivos e que causam impactos significativos na qualidade de vida do paciente. O tratamento quimioterápico, apesar de eficiente em aumentar a sobrevida, causa vários efeitos colaterais e não é específico para as células tumorais. Entretanto, nos últimos anos, ocorreu um grande avanço nas técnicas de imunoterapia, que começam a apresentar resultados muito promissores para tumores sólidos (Brenner, Kloor, Pox, 2014).

Nesse sentido, a busca por tratamentos mais específicos para as células cancerosas também foi direcionada à sinalização purinérgica, baseada no ATP e na adenosina (ADO). A ADO e o ATP atuam extracelularmente no contexto do sistema purinérgico, interagindo com receptores das famílias P1 e P2. Os receptores P1 respondem à ADO, enquanto os receptores P2 (P2X, P2Y) estão mais

relacionados à sinalização via ATP. Os receptores P1 são acoplados à proteína G, assim como os receptores P2Y, enquanto os receptores P2X estão ligados a canais iônicos. A interação entre os receptores purinérgicos e as moléculas sinalizadoras ocasiona respostas rápidas em conexões sinápticas, interações neuromusculares envolvendo músculos lisos e também nas secreções endócrinas e exócrinas. Essa sinalização é conhecida desde a década de 70 e, com o tempo, percebeu-se que o ATP e a ADO também influenciavam outros processos, como apoptose e crescimento celular. Não demorou a se pesquisar a influência dessas substâncias nos tumores; então, foi documentada a influência do ATP e da ADO nas mais variadas linhagens tumorais. Também se descobriu que diferenças na concentração de ATP podem influenciar as células de maneira diferente. Aparentemente, concentrações baixas de ATP extracelular no microambiente tumoral promovem a divisão celular, enquanto concentrações altas possuem o efeito contrário. Outro fator que influencia a consequência da ação do ATP (crescimento celular, diferenciação celular ou apoptose) é o tipo de receptor purinérgico expresso pelas células. Por exemplo, no melanoma, a estimulação dos receptores P2Y1 diminui a velocidade de proliferação celular, enquanto a estimulação de receptores P2Y2 causa um aumento na divisão celular (Burnstock, 2006; Burnstock, Di Virgilio, 2013).

No CCR, estão presentes diversas alterações em nível celular, que envolvem inclusive a sinalização purinérgica. O trato gastrointestinal é regulado por diversos mecanismos, incluindo uma interação complexa com o sistema nervoso central. Nesse processo, estão presentes diversos receptores relacionados ao sistema purinérgico, que atuam com uma ampla gama de efeitos, conforme exposto na Figura 2. Marcadamente, no cólon humano, existe a presença de diferentes linhagens de receptores P2Y, dentre eles, P2Y1, P2Y2, P2Y4 e P2Y6. Esses receptores são acoplados à proteína G e ativados por nucleotídeos, como ADP, UTP e UDP (Wan *et al.*, 2016).

Figura 2: Funções relacionadas aos receptores P2Y no trato gastrointestinal

Fonte: Wan *et al.* (2016) – adaptada pelos autores (2019).

Fica evidente a importância da sinalização purinérgica no contexto do CCR quando analisados parâmetros inflamatórios no ambiente tumoral. Para que ocorra a carcinogênese, são necessárias algumas condições que favoreçam o aparecimento de células neoplásicas, dentre elas a inflamação, levando à perda da homeostase e prejudicando o potencial regenerativo dos tecidos. Pacientes com doenças inflamatórias como retocolite ulcerativa ou doença de Crohn demonstram aumento na expressão de RNAm correspondente aos receptores P2Y2 e P2Y6, enquanto nos tumores colônicos em geral ocorre superexpressão dos receptores P2Y2 e P2Y4, em comparação a tecidos intestinais normais (Wan *et al.*, 2016).

Dessa forma, o sistema purinérgico passou a ser considerado como um potencial alvo terapêutico, e alguns estudos já demonstraram influência da estimulação ou inibição de receptores de nucleotídeos ou de ADO no crescimento e apoptose tumoral, dependendo da linhagem celular estudada. Como exemplo, linhagens celulares de CCR sofreram apoptose após a estimulação de receptores P2Y1 e P2Y2. Também existe relação entre a estimulação de receptores P2Y2 pelo ATP com a migração transendotelial dos tumores, que é um processo crucial para o desenvolvimento das metástases. Ou seja, o estudo do sistema purinérgico aplicado aos tumores de modo geral possui grande importância para o

desenvolvimento de terapias mais eficazes e direcionadas às células neoplásicas. Para que isso seja possível, é fundamental que sejam compreendidos os processos de sinalização celular e os atores envolvidos nesse processo (Wan *et al.*, 2016; Di Virgilio, Adinolfi, 2017).

Sistema Purinérgico e CCR

A atuação do sistema purinérgico nos cânceres de forma geral é marcante e, muitas vezes, antagônica. Pequenas alterações nas concentrações de ATP influenciam as células de maneira totalmente diferente. Baixas quantidades de ATP possuem efeito imunossupressor no microambiente tumoral, o que favorece a multiplicação de células neoplásicas, enquanto altas quantidades de ATP fora das células estão relacionadas à apoptose. Além disso, às vezes, o mesmo receptor possui ações diferentes, dependendo do tipo celular onde está expresso. No CCR, diferentes linhagens celulares podem apresentar ações distintas relacionadas à estimulação de um mesmo receptor, como o P2Y2 (Burnstock, Di Virgilio, 2013).

ATP e o crescimento ou apoptose celular

Em estudos comparando mucosa intestinal saudável com tecido tumoral, foi constatada a superexpressão dos receptores P2Y2 e P2Y4 nos tumores por meio de análises imunohistoquímicas e por western-blot, embora não se saiba o significado funcional deste achado (Chowdhury *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2016). Duas linhagens celulares de CCR (HCT8 e Caco-2) expressam o RNAm dos receptores P2Y1, 2, 4, 6, 11 e 12, e as proteínas de P2Y1 e P2Y2. Foi demonstrado que ATP em altas concentrações induz apoptose nestas células através do receptor P2Y1, e, em baixas concentrações, estimula a proliferação das células de CCR, provavelmente atuando nos receptores P2Y2 (Wan *et al.*, 2016).

Em estudo sobre a relação do estímulo de receptores P2 com a liberação de Interleucina-8 (IL-8) pelas células tumorais da linhagem HT-29, observou-se que a estimulação contínua dos receptores P2Y2 colônicos parece ter relação com o desenvolvimento de patologias, como Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa, pelo aumento na secreção de IL-8. Isso favorece o surgimento da inflamação e,

consequentemente, contribui para a progressão tumoral. É importante lembrar que as doenças inflamatórias intestinais aumentam dramaticamente as chances do desenvolvimento de alguma neoplasia maligna do cólon (Bahrami *et al.*, 2014).

Na linhagem celular HT-29, utilizada em diversas pesquisas referentes ao CCR, o ATP demonstrou aumentar as concentrações intracelulares de cálcio, ao mesmo tempo em que diminuiu a concentração intracelular de cloreto e de sódio, via estimulação de receptores P2 (Burnstock, Di Virgilio, 2013). Logo, o estímulo de receptores purinérgicos pode contribuir na modulação da proliferação e apoptose de células de CCR. Além disso, quando comparada à expressão do receptor P2Y2 no CCR e em células normais, o que se encontra é uma concentração maior do receptor nas células malignas, evidenciando a complexidade das reações mediadas via sistema purinérgico (Wan *et al.*, 2016).

ADO no microambiente tumoral

A ADO é um produto da degradação do ATP e, assim como o ATP, tem suas concentrações extracelulares aumentadas em caso de hipóxia tecidual e inflamação. Portanto, em diversas linhagens tumorais, as concentrações de ADO encontram-se elevadas (Sek *et al.*, 2018).

É amplamente difundido que o câncer consegue enganar o sistema imunológico para que possa ocorrer o crescimento desordenado de células, e a ADO parece ter papel fundamental nesse processo. A presença de ADO no ambiente extracelular promove imunossupressão, modulando a ação de linfócitos T, B e das células Natural Killer, o que cria um ambiente mais favorável para a progressão tumoral (Sek *et al.*, 2018).

A conversão de ATP/ADP/AMP em ADO depende de algumas enzimas expressas na membrana celular, dentre elas, a NTPDase (também chamada de CD39, converte ATP e ADP em AMP) e a 5'- nucleotidase (5-NT, denominada também de CD73, converte AMP em ADO), além de outra via envolvendo a CD38 (converte NAD+ em AMP). Em diversos tipos de cânceres a superexpressão de CD39 e CD73 está relacionada ao aumento no número de metástases para linfonodos e a um pior prognóstico do tumor, porém, curiosamente em algumas linhagens de CCR, as mesmas enzimas quando superexpressas relacionam-se a desfechos positivos (Jiang *et al.*, 2018; Sek *et al.*, 2018).

Outro ponto de divergência encontra-se na estimulação do receptor A3 de ADO, em geral, superexpresso nas células malignas de cólon. Em estudos que comparam diferentes linhagens de CCR, desfechos distintos ocorreram após a ativação desse receptor. Na linhagem HCT-116, a ativação do A3 levou a uma queda na proliferação das células neoplásicas, sendo que o contrário ocorreu quando o mesmo receptor foi estimulado na linhagem HT-29 (Gessi *et al.*, 2004; Sek *et al.*, 2018).

Sinalização purinérgica e a disseminação tumoral

Em um estudo recente com tumores colorretais coletados logo após cirurgia e submetidos a análises imunohistoquímicas e western-blot, o receptor P2X7 mostrou-se superexpresso nas amostras tumorais em relação aos tecidos normais, e essa alta expressão se correlacionou com tamanho do tumor, metástases linfáticas e estadiamento TNM. A expressão desse receptor pode servir, ainda, como um fator prognóstico independente de pior sobrevida, apesar de evidenciar potencial terapêutico (Qian *et al.*, 2017).

A deleção genética de CD39 e consequente diminuição nas quantidades extracelulares de AMP mostrou atrasar o crescimento tumoral e angiogênese contundente em modelos de camundongos. Além disso, dados sugerem que CD39 e as alterações na sinalização purinérgica têm efeitos moduladores sobre a disseminação do CCR, e os baixos níveis de RNAm de CD39 no tumor correlacionam-se com o aumento da sobrevida e formação tardia de metástases hepáticas (Künzli *et al.*, 2011; Sek *et al.*, 2018).

Possibilidades terapêuticas

O potencial diagnóstico do receptor P2X7 como um biomarcador tumoral tem sido investigado em alguns estudos clínicos, bem como sua associação com o CCR (Hebuterne, Caillon, 2014; Pinkerton, 2015).

A hipertermia clinicamente tolerável, mediada por receptores P2X7, tem importante efeito citotóxico em células de câncer de cólon da linhagem MCA38 (De Andrade Mello *et al.*, 2017), sugerindo que a combinação de agonistas do

receptor, tal qual o ATP, associado à hipertermia, é uma opção de tratamento clinicamente viável (Di Virgilio *et al.*, 2018). Os estudos *in vitro* demonstraram também que a ruptura genética ou inibição farmacológica dos receptores P2X7 fortemente diminui a energia do metabolismo (Adinolfi *et al.*, 2005; Ledderose *et al.*, 2016) e reduz as taxas de proliferação e invasão das células cancerosas (Baricordi *et al.*, 1999; Jelassi *et al.*, 2011), indicando que, até mesmo se uma célula tumoral se tornar refratária a uma droga direcionada aos receptores P2X7, a droga ainda poderia ter um efeito amplificador na redução do crescimento tumoral, agressividade e poder metastático (Di Virgilio *et al.*, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema purinérgico atua sobre o CCR. O entendimento dos mecanismos de desenvolvimento e progressão do CCR é importante para o estabelecimento de novas terapias. O ATP e a ADO têm papel decisivo tanto na progressão quanto na supressão tumoral através de suas diferenças de concentração no meio extracelular, bem como a expressão de receptores P2.

Apesar da importância em incidência de morbidade e mortalidade no Brasil e no mundo, ainda são poucos e divergentes os estudos relacionados ao CCR e sistema purinérgico, dificultando o desenvolvimento de pesquisas sobre novas possibilidades terapêuticas. Assim, são necessários mais estudos que associem o sistema purinérgico e o CCR.

REFERÊNCIAS

ADINOLFI, E. *et al.* Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. Molecular Biology of the Cell, v. 16, n. 7, p. 3260-3272, jul. 2005.

BAHRAMI, F. *et al.* Purine-Metabolizing Ectoenzymes Control IL-8 Production in Human Colon HT-29 Cells. Mediators of Inflammation, v. 2014, 2014.

BARICORDI, O. R. *et al.* Increased Proliferation Rate of Lymphoid Cells Transfected with the P2X 7 ATP Receptor. Journal of Biological Chemistry, v. 274, n. 47, p. 33206-33208, 19 nov. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de câncer no Brasil, 2018. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Rastreamento. Brasília, 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_atencao_primaria_29_rastreamento.pdf.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 12 set. 2018.

BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. P. Colorectal cancer. The Lancet, v. 383, n. 9927, p. 1490-1502, 26 abr. 2014.

BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. Pharmacological Reviews, v. 58, n. 1, p. 58-86, mar. 2006.

BURNSTOCK, G.; DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling and cancer. Purinergic Signalling, v. 9, n. 4, p. 491-540, dez. 2013.

CARRARO, P. G. *et al.* Obstructing colonic cancer: failure and survival patterns over a ten-year follow-up after one-stage curative surgery. Diseases of the Colon and Rectum, v. 44, n. 2, p. 243-250, fev. 2001.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; KLUMB, C. E.; MAIA, R. C.. P53 e as hemopatias malignas. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 48, n. 3, p. 419-427, jul. 2002.

CHAN, A. T.; GIOVANNUCCI, E. L. Primary Prevention of Colorectal Cancer. Gastroenterology, v. 138, n. 6, p. 2029-2043.e10, jun. 2010.

CHOWDHURY, M. A. *et al.* Effects of differentiation on purinergic and neurotensin-mediated calcium signaling in human HT-29 colon cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 439, n. 1, p. 35-39, 13 set. 2013.

DE ANDRADE MELLO, P. *et al.* Hyperthermia and associated changes in membrane fluidity potentiate P2X7 activation to promote tumor cell death. Oncotarget, v. 8, n. 40, p. 67254-67268, 15 set. 2017.

HEBUTERNE, X; CAILLON, C. Decoding of the Expression of Tumor Suppressor P2RX7 in Inflammatory and Malignant Colonic Mucosa – Full Text View – ClinicalTrials.gov. Nov., 2014. Disponível em: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02293811. Acesso em: 4 mar. 2019.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. Oncogene, v. 36, p. 1-11, 2017.

DI VIRGILIO, F. *et al.* Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. Nature Reviews. Cancer, v. 18, n. 10, p. 601-618, out. 2018.

FEARON, E. R. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v. 6, n. 1, p. 479-507, 28 fev. 2011.

GESSI, S. *et al.* Elevated expression of A3 adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells. Clin Cancer Res, v. 10, n. 17, p. 5895-5901, set. 2004.

JELASSI, B. *et al.* P2X7 receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. Oncogene, v. 30, n. 18, p. 2108-2122, maio 2011.

JIANG, T. *et al.* Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers. BMC Cancer, v. 18, 7 mar. 2018.

KATOH, H. *et al.* Prognostic significance of preoperative bowel obstruction in stage III colorectal cancer. Annals of Surgical Oncology, v. 18, n. 9, p. 2432-2441, set. 2011.

KUNZLI, B. M. *et al.* Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer. Purinergic Signal, v. 7, n. 2, p. 231-241, jun. 2011

KUNZMANN, A. T. *et al.* Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer and incident and recurrent adenoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 102, n. 4, p. 881-890, out. 2015.

LEDDEROSE, C. *et al.* Cutting off the power: inhibition of leukemia cell growth by pausing basal ATP release and P2X receptor signaling? Purinergic Signalling, v. 12, n. 3, p. 439-451, 2016.

MAJUMDAR, S. R.; FLETCHER, R. H.; EVANS, A. T. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. The American Journal of Gastroenterology, v. 94, n. 10, p. 3039-3045, out. 1999.

NOFFSINGER, A. E. Serrated Polyps and Colorectal Cancer: New Pathway to Malignancy. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v. 4, n. 1, p. 343-364, fev. 2009.

ØINES, M. *et al.* Epidemiology and risk factors of colorectal polyps. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, v. 31, n. 4, p. 419-424, ago. 2017.

PARREIRAS, F. C. *et al.* Genetic aspects of colorectal cancer and its impact on disease management. Revista Médica de Minas Gerais, v. 23, n. 2, 2013.

PINKERTON, J. Feasibility Study: Accuracy of Biomarker in Detection of Endometrial Cancer – Full Text View – ClinicalTrials.gov. Ago., 2015. Disponível em: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00471120. Acesso em: 4 mar. 2019.

QIAN, F. *et al.* High expression of P2X7R is an independent postoperative indicator of poor prognosis in Colorectal cancer. Human Pathology, v. 64, p. 61-68, june, 2017.

ROBBINS, S. L. (STANLEY L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V). Patologia [de] Robbins & Cotran: bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier, 2010.

ROTHWELL, P. M. *et al.* Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. Lancet (London, England), v. 376, n. 9754, p. 1741-1750, 20 nov. 2010.

SEK, K. *et al.* Targeting Adenosine Receptor Signaling in Cancer Immunotherapy. International Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 12, 2 dez. 2018.

SOETIKNO, R. M. *et al.* Prevalence of nonpolypoid (flat and depressed) colorectal neoplasms in asymptomatic and symptomatic adults. JAMA, v. 299, n. 9, p. 1027-1035, 5 mar. 2008.

WAN, H. *et al.* Important roles of P2Y receptors in the inflammation and cancer of digestive system. Oncotarget, v. 7, n. 19, p. 28736-28747, 2016.

WEISS, J. M. *et al.* Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results-Medicare data. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 29, n. 33, p. 4401-4409, 20 nov. 2011.

WOLF, A. M. D. *et al.* Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 68, n. 4, p. 250-281, 2018.

ZAUBER, A. G. *et al.* Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. The New England Journal of Medicine, v. 366, n. 8, p. 687-696, 23 fev. 2012.

CÂNCER DE MAMA E SISTEMA PURINÉRGICO

Ângelo Pereira de Lacerda
Heitor Silvino Gonzaga
Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

INTRODUÇÃO

Avanços recentes nas pesquisas relacionadas ao câncer têm mostrado os mecanismos de expansão e proliferação tumoral, principalmente relacionados ao sistema purinérgico. Todas as células do sistema imune e também as células tumorais expressam receptores de membrana para nucleosídeos e nucleotídeos, sendo eles adenosina (ADO), ATP e ADP, respectivamente. Além disso, uma característica marcante do microambiente tumoral é a concentração extremamente alta de ATP e ADO extracelular. Ambos modulam as respostas do tumor e do hospedeiro, em que, dependendo do receptor ativado por elas, medeiam-se respostas imunossupressoras ou imunoestimulação relacionada ao hospedeiro, podendo ocorrer a citotoxicidade no tumor ou seu crescimento (Di Virgilio *et al.*, 2017).

Em relação ao câncer de mama (CM), análises de expressão gênica mostram que células das linhagens de CM MCF7 e Hs578T têm expressão predominante de receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11 (Qiu *et al.*, 2018). E há dados pré-clínicos que mostram que receptores metabotrópicos do sistema purinérgico tipo P2Y podem dar suporte à invasão e metástase, promovendo a migração do câncer, sendo que o receptor P2Y2 exerce um papel fundamental na disseminação metastática, por estar altamente expresso nesse tipo de câncer (Di Virgilio *et al.*, 2017). Entretanto, a linhagem celular de CM, MDA-MB-231 não expressa

receptores de ATP, sendo necessárias mais pesquisas relacionadas aos diferentes tipos de linhagens celulares de CM. Também já é demonstrado que o bloqueio das ações de nucleotídeos no CM recém-diagnosticado pode complementar o tratamento padrão antiangiogênese (Buxton *et al.*, 2010).

Neste capítulo, serão tratados aspectos gerais do CM, além dos específicos relacionados ao sistema purinérgico, abordando questões do funcionamento da modulação do microambiente tumoral, sua metástase e potenciais terapias que utilizam os receptores do sistema purinérgico como alvos.

Câncer de mama (CM)

Segundo o Ministério da Saúde (INCA, 2018), o CM é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo em mulheres, atrás apenas do câncer de pele não melanoma. Segundo Bray *et al.* (2018), aproximadamente 2,08 milhões de mulheres foram diagnosticadas com CM no mundo; destas, 626.000 mortes foram decorrentes da doença. Para o ano de 2018, a estimativa era de 59.700 novos casos de CM no Brasil, correspondendo a cerca de 30% de todos os casos de câncer em mulheres. Em 2015, foram notificadas 15.403; em 2016, 16.254 mortes, respectivamente, devido à neoplasia maligna da mama (Brasil, 2017). Devido a melhorias no diagnóstico e no tratamento da doença, a taxa de sobrevida aumentou em 5 anos, e está entre 80 e 92% nos Estados Unidos (Siegel, Miller, Jemal, 2015). Porém, essa taxa diminui com o nível de agressividade do tumor (Berghuis *et al.*, 2017).

O CM na mulher tem etiologia multifatorial: idade acima dos 50 anos, com o dobro do risco após os 65 anos; história familiar e genética, como alterações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*; menarca antes dos 12 anos e menopausa após os 55 anos; nuliparidade; primeira gravidez após os 30 anos; obesidade e sobrepeso; sedentarismo e inatividade física; consumo de bebidas alcoólicas; exposição frequente à radiação ionizante; e história prévia de doenças benignas da mama (Bilimoria, Morrow, 1995; Kumar *et al.*, 2008; Inca, 2016).

Os carcinomas mamários são divididos em invasivos, quando ultrapassam o limite da membrana basal, e em não-invasivos (*in situ*), quando não ultrapassam. Podem também ser classificados conforme o tipo histológico específico: ductal, lobular, medular, mucinoso, tubular e outros tipos. Dentre eles, o carcinoma ductal

in situ é o tumor mais comum não invasivo, e o carcinoma ductal invasivo é o tumor invasivo mais comum, que corresponde a 70-80% dos casos (Kumar *et al.*, 2008). Ainda de acordo com a avaliação histológica dos tumores de mama, eles podem ser divididos em pouco, moderadamente ou bem diferenciados. Tumores pouco diferenciados apresentam mais resistência ao tratamento (Le Doussal *et al.*, 1989; Dillon *et al.*, 2014).

Segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), o CM pode ser classificado em até 21 tipos histológicos, com base na morfologia celular, crescimento e organização celular. O tipo histológico mais comum é o carcinoma ductal invasivo sem tipo especial, que inclui aqueles cânceres sem características peculiares para merecerem uma classificação diferenciada (Dieci *et al.*, 2014), devido à expressão de seus genes serem semelhantes com a do tecido epitelial normal da mama (Rivenbark, O'connor, Coleman, 2013). Alguns tipos especiais, como o carcinoma lobular invasivo, representam 25% de todos os cânceres de mama (Dieci *et al.*, 2014). O conhecimento de qual subtipo o tumor pertence, somado a marcadores clínicos e patológicos, é útil para explicar as características e a evolução da doença, além de apontar a melhor terapêutica para cada caso específico (Melichar, 2013).

Os detalhamentos das características do tumor são possíveis graças aos biomarcadores (Nalejska, Mączyńska, Lewandowska, 2014), que estão bastante difundidos na oncologia clínica e no CM. Os biomarcadores já definidos são: receptor de estrogênio (RE); receptor de progesterona (RP); receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2); antígeno carcinoembrionário (CEA); e CA 15-3 (Berghuis *et al.*, 2017). Entretanto, devido à diversidade genética da doença, novos biomarcadores estão sendo estudados (Prat, Perou, 2011). Com base na imuno-histoquímica (IHQ), o CM consiste em, pelo menos, três grupos principais: receptor de hormônio (HR) positivo (inclui RP e RE); HER2 positivo; e triplo-negativo (HR e HER2 negativos) (Dieci *et al.*, 2014).

Nos pilares do tratamento para o CM, estão a remoção cirúrgica do tumor, juntamente com quimioterapia e radioterapia. De forma complementar, a intervenção hormonal é a principal terapia direcionada a tumores HR-positivos; agentes anti-HER2 (como o Trastuzumabe), somados à quimioterapia ou terapia endócrina, são o tratamento padrão para tumores com superexpressão de HER2. A quimioterapia representa o único método de tratamento, além do cirúrgico,

para cânceres de mama triplo-negativo, porque nenhuma terapia direcionada está disponível até o momento (Prat *et al.*, 2015).

Estudos de expressão gênica em tumores de mama propuseram subtipos moleculares baseados em diferentes perfis de expressão gênica, os subtipos intrínsecos do CM. Identificou-se, inicialmente, cinco subgrupos com prognósticos e sensibilidades diferentes aos tratamentos: luminal (A e B), HER2 enriquecido, basal, *claudin-low*, e um grupo semelhante ao normal. (Sørlie *et al.*, 2001; Sørlie *et al.*, 2003; Dieci *et al.*, 2014; Prat *et al.*, 2015). No estudo de Farmer *et al.* (2005), foi proposto o subtipo apócrino molecular, o qual apresenta aumento da sinalização androgênica. Um outro subtipo, rico em interferon, caracterizado pela superexpressão de genes regulados pelo interferon, foi descrito em 2006 por Hu e colaboradores.

Tumores HR positivos agrupam-se principalmente dentro do subtipo luminal, que pode ser dividido em dois subtipos – Luminal A e Luminal B. O subtipo Luminal A caracteriza-se pela alta positividade para RE e RP, pela ausência de amplificação ou superexpressão de HER2, e pela avaliação do marcador Ki-67 (índice de proliferação tumoral calculado por anticorpo, que marca os núcleos de células que estão em qualquer fase do ciclo celular) menor do que 14%, sendo sensível à hormonioterapia, com o melhor prognóstico dentre os subtipos intrínsecos. O subtipo Luminal B é positivo para RE, tem amplificação de HER2, e Ki-67 maior do que 14%, com um prognóstico intermediário (Prat e Perou, 2011). O tratamento adjuvante para este subtipo tumoral pode ocorrer por terapias antiestrogênicas, assim como se pode utilizar a droga trastuzumabe, anticorpo monoclonal que tem como alvo tumores com superexpressão de HER2 (Harrell *et al.*, 2012; Goldhirsch *et al.*, 2013). Tumores HER2+/HR- agrupam-se principalmente dentro do subgrupo HER2 enriquecido (que não expressam RE). Os tumores triplos negativos, estão contidos no subtipo basal e claudin-low, os quais têm origem em células-tronco ou células luminais indiferenciadas. Por serem pouco diferenciados, os tumores de mama triplo negativos têm poucas possibilidades terapêuticas e, por isso, apresentam um prognóstico reservado (Prat e Perou, 2009; Barros e Leite, 2015; Prat *et al.*, 2015).

Na avaliação do CM, o estadiamento clínico é primordial, e o sistema TNM do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) é o mais utilizado, onde T avalia o tamanho tumoral e o grau de invasão local, N avalia o envolvimento de linfonodos regionais, e M avalia a existência de metástases a distância (Tabela 1). Na

maioria das vezes, as células do tumor de mama se disseminam inicialmente para os linfonodos axilares. De acordo com a *American Cancer Society*, o linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo que recebe a drenagem linfática derivada do tumor. Sua biópsia é a forma mais comum e menos invasiva de predizer se houve disseminação do câncer para a axila, e sua detecção é necessária não somente para verificar a disseminação do tumor para a axila, mas também para evitar a linfadenectomia axilar total em pacientes sem comprometimento metastático em linfonodos. Caso o linfonodo sentinela esteja comprometido, os linfonodos seguintes serão avaliados; caso o linfonodo sentinela esteja preservado, é sinal de que não há disseminação proximal (Giuliano *et al.*, 2017).

Tabela 1. Estágios do CM

Estágios	TNM
Estágio 0	Tis, N0, M0
Estágio IA	T1, N0, M0
Estágio IB	T0 ou T1, N1mi, M0
Estágio IIA	T0 ou T1, N1, M0; T2, N0, M0
Estágio IIB	T2, N1, M0; T3, N0, M0
Estágio IIIA	T0 a T2, N2, M0; T3, N1 ou N2. M0
Estágio IIIB	T4, N0 a N2, M0
Estágio IIIC	Qualquer T, N3, M0
Estágio IV	Qualquer T, Qualquer N, M1

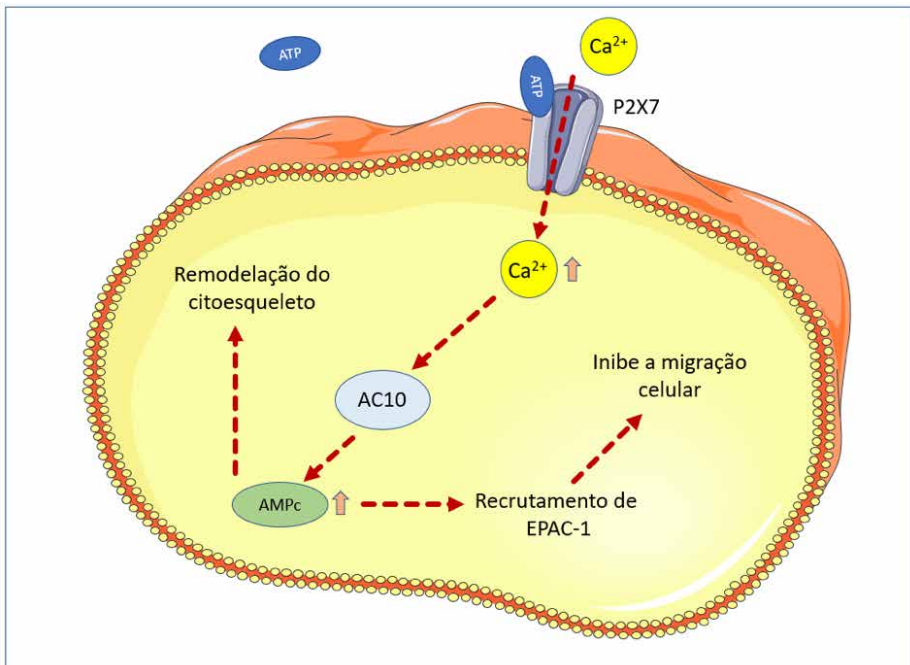
Fonte: Giuliano *et al.* (2017) – adaptada.

* Estadiamento do CM baseado na classificação TNM. Tis: carcinoma ductal in situ; T0: sem evidência de tumor primário; T1: tumor menor que 2 cm de diâmetro; T3: tumor entre 2 e 5 cm de diâmetro; tumor de qualquer tamanho que invadiu o tórax ou a pele (ulceração ou nódulos macroscópicos). N0: sem metástases em linfonodos regionais; N1mi: micrometástases (aproximadamente 200 células, maior que 0,2 mm e menor que 2,0 mm); N1: Disseminação para 1 ou 3 linfonodos axilares e/ou mamários internos; N2: Disseminação para 4 ou 9 linfonodos axilares e/ou mamários internos; N3: disseminação para 10 ou mais linfonodos axilares ou disseminação para linfonodos subclaviculares. M0: sem evidência clínica ou radiológica de metástases à distância; M1: Metástases distantes detectável clínica ou radiologicamente.

Sistema Purinérgico e Câncer

A sinalização purinérgica está envolvida na inflamação e no câncer, isso porque o ATP extracelular se acumula no interstício do tumor (Di Virgilio *et al.*, 2017). A ativação dos receptores P2X7 e P2Y11 pela alta concentração de ATP, > 20 µM (a concentração em tecidos saudáveis está abaixo de 1 a 5 µM), inibe a migração de células endoteliais derivadas do tumor, e melhora a atração de pericitos. O aumento da atração dos pericitos leva a uma diminuição da permeabilidade endotelial, marcando a normalização do vaso. Existem dois mecanismos que explicam este processo: a alta concentração extracelular de ATP estimula os receptores P2X7 e P2Y11. O feito da ligação do ATP em P2X7 é a entrada de cálcio (Ca2+) para a célula, e, em P2Y11, a ação do ATP ativa a produção de Inositol 3-fosfato (InsP3) pela proteína Gq e PCL beta. O InsP3 age em receptores IP3 no retículo endoplasmático, promovendo a liberação de Ca2+ para o citosol. Portanto, esses dois mecanismos distintos levam a um aumento da concentração de Ca2+ citoplasmático, que, por sua vez, ativa a adenilil ciclase 10 (AC10), resultando em um aumento de Adenosina Monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, que conduz a remodelação do citoesqueleto. A elevada concentração de AMPc também recruta a Proteína de Troca Diretamente Ativada pelo AMPc (EPAC-1), que medeia o efeito inibitório sobre a migração de células tumorais de CM, o que se verifica na Figura 1 (Avanzato *et al.*, 2016). Portanto, a ativação dos

receptores P2X7 e P2Y11 inibe a migração de células tumorais da mama, sendo um dos mecanismos contra o desenvolvimento de metástases e que poderá ser alvo de terapias na prevenção de metástases mamárias.

Figura 1: Ativação do receptor P2X7 pelo ATP extracelular em célula tumoral de CM

Fonte: Avanzato *et al.* (2016) – adaptada.

* A ativação do receptor P2X7 pelo ATP promove a entrada de Ca2+ para o meio intracelular, que se liga à enzima AC10, resultando no aumento de AMPc intracelular. A concentração elevada de AMPc induz a remodelação do citoesqueleto e inibe a migração das células de CM.

Concentrações elevadas de ATP inibem seletivamente a migração e a tubulogênese de células tumorais endoteliais de carcinoma de mama, mas não de células endoteliais normais, sendo que doses mais baixas são ineficazes. A tubulogênese é a base biológica para as funções de transporte tubular. Consiste em um processo complexo de organização da arquitetura epitelial e precisa de uma

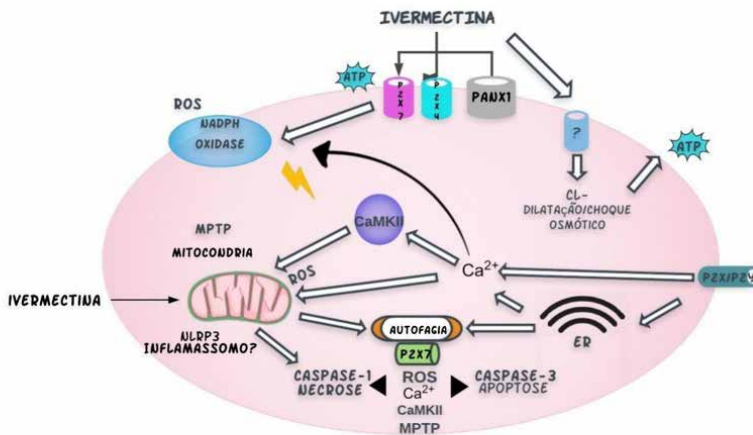
coordenação refinada de vários processos celulares e moleculares. Entre eles, destacam-se a mitose, apoptose, polarização, diferenciação, adesão, motilidade, organização do citoesqueleto, proteólise e uma série de vias de sinalização intracelular (Karihaloo *et al.*, 2005). Em particular, a baixa afinidade de P2X7 para ATP fornece uma boa correlação mecanicista com a evidência de que apenas altas concentrações de ATP inibem a migração de células tumorais no CM (Avanzato *et al.*, 2016).

Efeitos opostos do ATP e da Sinalização Purinérgica

O ATP extracelular está envolvido em processos de defesa e reparo tecidual via sinalização dos receptores purinérgicos P1, P2X e P2Y. Altas concentrações de ATP estão associadas a fortes respostas inflamatórias e morte celular (Burnstock e Verkhratsky, 2010). Porém, a sinalização por P2X7 foi descrita associada ao crescimento tumoral e à metástase. Dessa forma, é possível perceber um papel duplo do ATP nas funções das células, ou seja, ele pode atuar tanto como um sinal imuno ativador quanto atuar na progressão do câncer (Draganov *et al.*, 2015).

A alta concentração de ATP é uma das características do microambiente tumoral, e o ATP e a sinalização purinérgica desempenham funções diversas e muitas vezes opostas, como muitas das funções complexas do microambiente tumoral. O crescimento e a sobrevivência do tumor parecem depender dos altos níveis de ATP exógeno, equilibrando as funções citotóxicas e pró tumorais (Draganov *et al.*, 2015).

Por isso, o uso de moduladores dos receptores purinérgicos estão sendo estudados como possíveis medidas terapêuticas para o câncer. Contudo, a utilização de agonistas de P2X7, como moléculas sintéticas que mimetizam o ATP, Adenosina 5'-O-(3-Tio)trifosfato (ATPγS) ou 2'(3')-O-(4-Benzoilbenzoil) adenosina 5'-trifosfato trimetilamônio (Bz-ATP), é difícil de ser estudada, devido à toxicidade sistêmica e falha em alavancar as concentrações elevadas de ATP encontradas no microambiente tumoral, muito devido à degradação por ATPases extracelulares. Tendo isso em vista, alguns estudos utilizaram Ivermectina, um antiparasitário que está associado a uma atividade antitumoral, como modulador alostérico dos receptores purinérgicos, conforme mostra a Figura 2 (Draganov *et al.*, 2015).

Figura 2: Ativação dos receptores P2X4/P2X7/PANEXINA-1 pela Ivermectina e suas ações intracelulares

Fonte: Draganov *et al.* (2015) – adaptada.

* Modelo de indução dos canais P2X4 e P2X7 dependentes de Pannexin-1 pela Ivermectina, a qual também induz a liberação de ATP, levando à morte da célula tumoral de CM. A sinalização aumentada do receptor P2X7 promove um mecanismo necrótico/piroptótico de rápida progressão, fomentado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas por NADPH oxidases, ativação citosólica de Ca2 +/CaMKII e MPTP, e caracterizado pela clivagem da caspase-1. A necrose é seguida por um programa de morte celular apoptótica progressivo mais lento, mediado por ativação de caspase-3. Os danos mitocondriais, estresse de ER, bem como o potencial esgotamento das reservas celulares de ATP, promovem, simultaneamente, a autofagia, que torna ainda mais lenta a via apoptótica.

A Ivermectina estimula a sinalização de P2X4/P2X7/Pannexina-1 e promove um desequilíbrio da dupla função purinérgica, contribuindo para a morte de células cancerosas. O mecanismo ocorre através da abertura aumentada de Pannexin-1 controlados por P2X4/P2X7, que induzem morte das células cancerosas

através de um modo misto entre apoptose e necrose associado, com ativação da Caspase-1 e piroptose (morte celular programada em resposta a infecções intracelulares, ativadas por INF-Y, e via caspase 1). A Ivermectina é capaz de matar células de CM triplo negativos em camundongos e humanos, através da sinalização P2X7 aumentada. Como o ATP desempenha um papel proeminente na regulação do volume celular e promove a morte das células cancerosas em resposta ao estresse hipotônico, supôs-se que a Ivermectina mata células cancerosas, em parte, aumentando a sensibilidade do P2X7 ao ATP, de modo que conduziria à morte celular por mecanismos apoptóticos e não apoptóticos (Draganov *et al.*, 2015).

A morte de células cancerosas depende da liberação de ATP e sinais de morte mediados por P2X7. O P2X7 pode ser revertido por radicais ativos de oxigênio gerados por NADPH oxidases, proteína cinase dependente de Ca2+/calmodulina (caMKII) ou por poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A Ivermectina induz autofagia e liberação de ATP e proteína do grupo de alta mobilidade B1 (HMGB1), importantes mediadores da inflamação. A sinalização potenciada de P2X4/P2X7 está quase que exclusivamente ligada ao microambiente tumoral, pois é rico em ATP, o que explica a seletividade tumoral da modulação de receptores purinérgicos (Draganov *et al.*, 2015).

Motilidade Celular

Algumas ectonucleotidases acopladas à membrana, como a ecto-nucleotídeo pirofosfatase (ENPP1), hidrolisam o ATP diretamente a ADO, que, por sua vez, estimula os receptores A1, A2A, A2B e A3. O receptor A3 é responsável por quimiotaxia e motilidade de neutrófilos, células epiteliais mamárias humanas benignas (HMEC) e células de CM. Nos neutrófilos e nas HMEC, os receptores A3 estão expressos de forma moderada e se concentram em um polo da célula. Entretanto, nas células de CM, MDA-MB-231, altamente metastáticas, os receptores A3 estão superexpressos e se encontram distribuídos por toda a célula. Além disso, as células MDA-MB-231 superexpressam ectonucleotidases ENPP1 e ecto-5' nucleotidase (CD73), que convertem ATP extracelular à ADO, que estimula os receptores A3, responsáveis pela migração celular (Ledderose *et al.*, 2016).

Dessa forma, poderia-se pensar que a estimulação de A3 contribuiria para a alta taxa de metástase das células MDA-MB-231, visto que a estimulação desse

receptor nos neutrófilos e HMEC promovem a migração celular. No entanto, em um estudo recente (Ledderose *et al.*, 2016), a ADO exógena adicionada a células de câncer da mama ou o agonista do receptor A3, adenosina-5'-N-metiluronamida (IB-MECA), interromperam de forma dependente da dose a motilidade celular por estimulação simultânea dos receptores, reduzindo a velocidade de migração em 75%. A justificativa para essa redução da motilidade celular foi a distribuição dos receptores A3 nas células cancerosas. Como eles estão distribuídos por toda a célula, a estimulação simultânea solicita sua migração em direções opostas, e o resultado é uma inibição da motilidade. Esse processo funciona como uma soma vetorial, em que as forças opostas se anulam.

O motivo da alta taxa de metástases da linhagem de CM, MDA-MB-231, está relacionado a níveis mais altos de ATP e maior atividade de P2Y2 do que a linhagem de CM menos metastática, MCF-7, ou a células epiteliais e endoteliais normais (ECs) sob condições normóxica e hipóxica. A ativação de P2Y2 por ATP liberado de células MDA-MB-231 induziu hipóxia pela expressão do fator-1α hipóxia indutor, secreção de lisil oxidase e colágeno, gerando um microambiente propício para formação de um nicho pré-metastático (Eun *et al.*, 2015).

O P2Y2 é um receptor purinérgico acoplado à proteína Gq, ativado tanto pelo ATP como por UTP. A ativação de P2Y2 também contribui com a progressão de cada etapa do processo de metástase, incluindo angiogênese, intravasamento, invasão e crescimento tumoral. Esse receptor purinérgico ativa várias vias de sinalização intracelular, promovendo a mobilização de Ca2+ intracelular e fosfolipase C (PLC), e ativação da proteína quinase C (PKC). O receptor P2Y2 interage com as integrinas αVβ3/5 para regular as atividades da Pequena GTPase pertencente à família Ras (Rho) e a Rho quinase (ROCK), proteínas que interagem com o citoesqueleto e regulam o movimento celular. Ademais, o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α) também é um fator essencial na progressão tumoral e metástase, pois atua elevando significativamente a liberação de ATP nas células altamente metastáticas de CM, MDA-MB-231 e SK-BR-3 (Eun *et al.*, 2015).

No estudo de Eun *et al.* (2015), as células MDA-MB-231 e SK-BR-3, linhagens metastáticas, apresentaram maior taxa de invasão que células das linhagens de CM, MCF-7 e T47D, não metastáticas, em um nível basal, o que foi abolido através do nocaute de P2Y2 ou da presença de apirase, uma enzima que hidrolisa nucleotídeos extracelulares. Células MDA-MB-231 também mostraram altos níveis de marcadores mesenquimais, como Caracol, Vimentina e N-caderina,

mas não o marcador epitelial E-caderina, e essa expressão foi inibida através da degradação de ATP ou nocaute de P2Y2. Além disso, as células SK-BR-3 e MDA-MB-231 exibiram níveis de fosforilação da Quinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK) e PKC mais elevados do que as células T47D e MCF-7, e os níveis de fosfo-ERK e -PKC supra regulados em células MDA-MB-231 foram significativamente reduzidos por apirase ou nocaute de P2Y2. Inibidores específicos de ERK, PKC e PLC reduziram significativamente a invasão e os níveis de expressão de marcadores mesenquimais em células MDA-MB-231. Esses resultados sugerem que as vias de ERK e PKC superativadas estão envolvidas na invasão metastática mediada por P2Y2 de células de CM.

O receptor P2Y2 também está envolvido na invasão de células de CM através do eixo P2Y2-b catenina. Assim, o bloqueio do receptor P2Y2 poderia suprimir o potencial invasivo e metastático das células do CM, podendo servir como alvo potencial para intervenções terapêuticas no CM (Zhang *et al.*, 2017).

De forma análoga, o receptor P2X7 também está envolvido na invasão e migração de células de CM através da via da Proteína Quinase B (AKT), que está relacionada à síntese proteica, proliferação e motilidade celular. Esse receptor é estimulado pelo ATP e pelo seu análogo Bz-ATP, mas não pelo ADP, e está superexpresso nas células de CM, T47D. No estudo de Xia *et al.* (2015), altas concentrações de ATP extracelular atuando em P2X7 estimularam a migração e invasão das células T47D, regularam negativamente o nível da proteína E-caderina e elevaram a produção de MMP-13 (colagenase de regulação complexa relacionada com a degradação da matriz extracelular). Esses resultados revelam que essas vias podem estar relacionadas com metástases em CM e ainda mostram um possível potencial terapêutico (Eun *et al.*, 2015).

Portanto, é conhecido que os receptores purinérgicos P2Y2, P2X7 e o receptor A3 de ADO estão intimamente relacionados com a motilidade e migração de células de CM. Os receptores estão altamente expressos em tipos celulares do câncer mamário e são ativados pelas altas concentrações de seus agonistas, endógenos ou exógenos.

Hipóxia e Câncer

A causa de hipóxia, um estado de baixo teor de oxigênio nos tecidos orgânicos, é atribuída a diversos fatores, como qualquer alteração nos mecanismos de transporte de oxigênio. Em estudos com linhagens celulares, são utilizados aparelhos que simulam a redução inspirada de oxigênio (Oliveira *et al.*, 2017).

O microambiente de muitos cânceres tem a presença característica de hipóxia, podendo desencadear a transição epitelial-mesenquimal, onde as células adquirem fenótipo mais invasivo e com maior sobrevida. O tratamento com hipóxia (1% O2) está relacionado à redução significativa na sensibilidade das células metastáticas de CM, MDA-MB-468, ao ATP, sendo observado também alteração nos níveis de expressão gênica dos receptores purinérgicos P2X e P2Y. A expressão dos receptores P2X4, P2X5, P2X7, P2Y1 e P2Y11 diminuiu, enquanto a expressão de P2Y6 aumentou com a hipóxia. A expressão aumentada de P2Y6 foi relacionado à redução da taxa de sobrevida de pacientes com CM. Esses níveis de expressão estão também aumentados em tumores de mama basais, e sua inibição por meio do composto químico 1,4-di-(feniltioureido) butano – MRS2578 –, um inibidor seletivo de receptores P2Y6, reduziu a migração de células do CM, podendo representar um novo alvo para terapias contra metástases nesse tipo de câncer (Mamedova *et al.*, 2004; Azimi *et al.*, 2016).

Além disso, análises de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) em células MDA-MB-468, buscando a expressão dos receptores purinérgicos P2Y e P2X, mostraram que os receptores P2X5 estão enriquecidos no fenótipo mesenquimal do câncer e que sua inibição tem como consequência uma redução significativa (25%) na expressão da proteína vimentina induzida pelo fator de crescimento epitelial (EGF), indicando a associação do receptor P2X5 com o processo de metástase (Davis *et al.*, 2011).

Sinalização Purinérgica e outros potenciais terapêuticos

Já se sabe que a sinalização purinérgica é importante na modulação das respostas imunes, entretanto seu potencial terapêutico no microambiente tumoral ainda é pouco conhecido e descrito. O receptor P2Y6 está mutado e expresso em grande quantidade nos tecidos de CM e se relaciona com o prognóstico ruim

em pacientes, e o nível de expressão desse receptor está diretamente ligado com a malignidade, estágio e classificação do CM (Ma *et al.*, 2016).

Foram utilizadas análises de expressão gênica por RT-qPCR e de expressão protéica por Western Blotting em linhagens celulares de CM do tipo MDA-MB-231, Hs578t, BT-549 e MCF-7 para detectar os níveis de expressão do receptor P2Y6. A linhagem MDA-MB-231 foi tratada com UDP a fim de investigar a migração e invasão celular, mostrando efeito indutivo do UDP/P2Y6 na migração e invasão das células de câncer. Quando se inibiu a expressão dos receptores P2Y6 através do inibidor seletivo MRS2578, notou-se a diminuição da migração basal das células, migração induzida por UDP e, por consequência, também houve diminuição da invasão celular, confirmando papel importante desse receptor no processo de metástase (Ma *et al.*, 2016).

Esses resultados indicam um mecanismo autônomo de células de CM quando tratadas com drogas que evadem do tumor in situ através da estimulação extracelular de UDP e P2Y6, demonstrando que a sinalização purinérgica tem um alto potencial para ser usada como alvo de fármacos que atuam prevenindo metástases no CM (Ma *et al.*, 2016).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O papel crítico do receptor P2Y2 foi demonstrando, podendo ser um alvo terapêutico em potencial no tratamento do CM. Por outro lado, a expressão de vários outros tipos de receptores P2Y e também de outros subtipos de receptores mediados por ATP não deve ser ignorada, uma vez que a associação deles é um caminho ainda a ser pesquisado (Qiu *et al.*, 2018). Apesar de já terem sido identificadas muitas vias de liberação de ATP em diferentes tipos celulares, o mecanismo dessa liberação ainda não foi completamente caracterizado. Ademais, é crescente no momento o consenso de que a ADO e o ATP são fundamentais no microambiente tumoral, afetando o crescimento do tumor, funções das células imunes e modulando de diferentes formas a interação entre o hospedeiro e o tumor. Por fim, espera-se que uma escolha minuciosa do receptor purinérgico, juntamente com moduladores de vias adenosinérgicas extracelulares, possa surgir

como novas terapias anticâncer, inibindo o crescimento tumoral e aumentando a resposta antitumoral do hospedeiro (Di Virgilio *et al.*, 2017).

Após a leitura, é importante notar que, por se tratar de um assunto relativamente novo, há necessidade de mais pesquisas na área, para melhor esclarecer o funcionamento do sistema purinérgico relacionado ao CM. Como potenciais terapêuticos a serem investigados com maior profundidade, estão a ativação dos receptores P2X7 e P2X11, inibindo a migração de células tumorais da mama, a baixa afinidade do P2X7 para ATP e a inibição da migração tumoral em altas concentrações de ATP, sendo essas altas concentrações também relacionadas à resposta inflamatória e morte celular. Ainda sobre o receptor P2X7, é necessário destacar sua associação ao crescimento tumoral e à metástase, tendo o ATP uma dupla função na célula, como imuno ativador e atuando na progressão tumoral. Ressalta-se também a ligação dos receptores P2X5, A3 e P2Y2 com metástase de CM. Esse último tem seu bloqueio relacionado à supressão do potencial invasivo e metastático das células cancerosas, podendo servir como alvo potencial para intervenções terapêuticas. Sendo assim, moduladores dos receptores purinérgicos já estão sendo estudados como possíveis medidas terapêuticas. Além dos receptores, o antiparasitário Ivermectina também está associado a uma atividade antitumoral, como modulador alostérico dos receptores purinérgicos.

REFERÊNCIAS

AVANZATO, D. *et al.* Activation of P2X7 and P2Y11 purinergic receptors inhibits migration and normalizes tumor derived endothelial cells via cAMP signaling. Scientific Reports, v. 6, 32602: 2016.

AZIMI, I.; BEILBY, H.; DAVIS, F. M.; MARCIAL, D. L.; KENNY, P. A.; THOMPSON, E. W.; ROBERTS-THOMPSON, E. W.; ROBERTS-THOMPSON, S. J.; MONTEITH, G. R. Altered purinergic receptor-Ca2+ signaling associated with hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. Molecular Oncology. v. 10, p. 166-178, 2016.

BARROS, A. C. S. D. DE; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. Revista Brasileira de Mastologia, v. 25, n. 4, p. 146-155, 2015.

BERGHUIS, A. M. S. *et al.* Detecting Blood-Based Biomarkers in Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review of Their Current Status and Clinical Utility. International journal of molecular sciences, v. 18, n. 2, 9 fev. 2017.

BILIMORIA, M. M.; MORROW, M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. CA: a cancer journal for clinicians, v. 45, n. 5, p. 263-78, [s.d.].

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Sistema de informações sobre mortalidade. Brasília, DF, 2017. Disponível em: http: // www.inca.gov.br/. Acesso em: 24 mar. 2017.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancer in 185 countries. A Cancer Journal for Clinicians, v. 68, n. 6, p. 394-424, nov. 2018.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. Cell Death Disease, v. 1, n. 1, jan. 2010.

BUXTON, I. L. O.; YOKDANG N.; MATZ, R. M. Purinergic Mechanisms in Breast Cancer Support Intravasation, Extravasation and Angiogenesis. Cancer Lett, v. 291, n. 2, p. 131-41, 2010.

DAVIS, F. M.; KENNY, P. A.; SOO, E. T-L.; VAN DENDEREN, B. J. W.; THOMPSON, E. W.; CABOT, P. J.; PARAT, M-O.; ROBERTS-THOMSON, S. J.; MONTEITH, G. R. Remodeling of Purinergic Receptor-Mediated Ca2+ Signaling as a Consequence of EGF-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. PLoS ONE, v. 6, n. 8, 2011.

DIECI, M. V. *et al.* Rare Breast Cancer Subtypes: Histological, Molecular, and Clinical Peculiarities. The Oncologist, v. 19, p. 805-813, jun. 2014.

DILLON, D.; GUIDI, A. J.; & SCHNITT, S. J. Pathology of invasive breast cancer. Diseases of the breast, n. 5, p. 381-410, 2014.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. Oncogene, v. 36, n. 3, p. 293-303, 2017.

DRAGANOV, D. *et al.* Modulation of P2X4/P2X7/ Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. Scientific reports, v. 5, 16222: 2015.

EUN, S. Y. *et al.* P2Y2 nucleotide receptor-mediated extracellular signal-regulated kinases and protein kinase C activation induces the invasion of highly metastatic breast cancer cells. Oncology reports, v. 34, p. 195-202, abr. 2015.

FARMER, P. *et al.* Identification of molecular apocrine breast tumors by microarray analysis. Oncogene, v. 24, p. 4660-4671, 2005.

GIULIANO, A. *et al.* Breast Cancer – Major chances in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. Cancer journal for Clinicians, v. 64, n. 4, p. 290-303, mar. 2017.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Annals of Oncology, v. 24, p. 2206-2223, jul. 2013.

HARRELL, J. C. *et al.* Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. Breast Cancer Research and Treatment, v. 132, n. 2, p. 523-535, abr. 2012.

HU, Z. *et al.* The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. BMC Genomics, v. 7, p. 96, 2006.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: http://www.inca.gov.br/, 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: https://www.inca.gov.br/, 2017.

KARIHALOO, A. *et al.* Signals Which Build a Tubule. Nephron Exp. Nephrol, v. 100, p. 40-45, 2005.

KUMAR, V; ABBAS A. K.; FAUSTO N.; MITCHELL R. N. Robbins Patologia Básica. 8a edição. Rio de janeiro: Elsevier, 2008.

LEDDEROSE, C. *et al.* Adenosine arrests breast cancer cell motility by A3 receptor stimulation. Purinergic signalling, v. 12, p. 673-685, ago. 2016.

LE DOUSSAL, V.; TUBIANA-HULIN, M.; FRIEDMAN, S.; HACENE, K.; SPYRATOS, F.; BRUNET, M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas, Cancer, v. 64, n. 9, p. 1914-1921, 1989.

MA, X.; PAN, X.; WEI, Y.; TAN, B.; YANG, L.; REN, H.; QIAN, M.; DU, B. Chemotherapy-induced uridine diphosphate release promotes breast cancer metastasis through P2Y6 activation. Oncatarget, n. 20, v. 7, 2016.

MAMEDOVA, L. K. *et al.* Diisothiocyanate derivates as potent, insurmountable antagonists of P2Y6 nucleotide receptors. Biochemical pharmacology, v. 67, n. 9, p. 1763-1770, 2004.

MELICHAR, B. Biomarkers in the treatment of cancer: opportunities and pitfalls. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v. 51, n. 7, p. 1329-33, 1º jan. 2013.

NALEJSKA, E.; MĄCZYŃSKA, E.; LEWANDOWSKA, M. A. Prognostic and Predictive Biomarkers: Tools in Personalized Oncology. Molecular Diagnosis & Therapy, v. 18, n. 3, p. 273-284, 3 jun. 2014.

OLIVEIRA, A. L. M. B.; ROHAN, P. A.; GONÇALVES, T. R.; SOARES, P. P. S. Efeitos da Hipóxia na Variabilidade da Frequência Cardíaca em Indivíduos Saudáveis: Uma Revisão Sistemática. International Journal of Cardiovascular Sciences, v. 30, n. 3, p. 251-261, 2017.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Molecular Oncology, v. 5, n. 1, p. 5-23, fev. 2011.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Mammary development meets cancer genomics. Nature Medicine, v. 15, n. 8, p. 842–844, ago. 2009.

PRAT, A. *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. The Breast, v. 26, p. 26-35, 2015.

QIU, Y.; LIU, Y.; LI, W. H.; ZHANG, H. Q.; TIAN, X. X.; FANG, W. G. P2Y2 receptor promotes the migration and invasion of breast cancer cells via EMT-related genes Snail and E-cadherin. Oncol reports, v. 39, n 1, p. 138-150, 2018.

RIVENBARK, A. G.; O'CONNOR, S. M.; COLEMAN, W. B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. American Journal of Pathology, v. 183, n. 4, p. 1113-1124, 2013.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 65, n. 1, p. 5–29, jan. 2015.

SØRLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LØNNING, P. E.; BØRRESENDALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 98, p. 10869-10874, 2001.

SØRLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J. S.; NOBEL, A.; DENG, S.; JOHNSEN, H.; PESICH, R.; GEISLER, S.; DEMETER, J.; PEROU, C. M.; LØNNING, P. E.; BROWN, P. O.; BØRRESEN-DALE, A. L.; BOTSTEIN, D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 100, p. 8418-8423, 2003.

XIA, J. *et al.* P2X7 receptor stimulates breast cancer cell invasion and migration via the AKT pathway. Oncology reports, v. 34, p. 103-110, mar. 2015.

ZHANG, J. *et al.* ATP-P2Y2-b-catenin axis promotes cell invasion in breast cancer cells. Cancer Science, v. 108, n. 7, p. 1318-1327, jul. 2017.

MELANOMA CUTÂNEO E SISTEMA PURINÉRGICO

Aline Mânica
Margarete Dulce Bagatini

INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo (MC) é a forma mais letal de câncer de pele, resultante da transformação maligna dos melanócitos – células produtoras do pigmento melanina (Milac, Negroiu, 2018). A cor da pele, dos olhos e dos cabelos depende da quantidade, qualidade e distribuição da melanina, a qual tem importante papel na proteção contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta (UVR) (Pillaiyar, Manickam, Jung, 2017).

A incidência de MC tem aumentado mundialmente. As regiões mais afetadas são as povoadas por indivíduos de descendência europeia. No geral, a incidência aumenta de acordo com a exposição cumulativa aos raios ultravioletas (UV) e de acordo com a idade. Dentre todos os continentes, as maiores taxas de MC são encontradas na Austrália (40 casos por 100.000 habitantes), seguida pela América do Norte e Europa (> 10 casos por 100.000 habitantes). Casos raros são observados na Ásia e na África (<0,5 casos por 100.000 habitantes) (Filipp *et al.*, 2018).

Apesar de representar menos de 10% dos cânceres de pele, o MC é considerado o responsável pela maioria das mortes relacionadas com esse tipo de câncer (Pastushenko *et al.*, 2014), pois desenvolve metástases em órgãos vitais, como cérebro, pulmões e fígado, em um curto período de tempo (Zheng, Traspas, Ortiz-Urda, 2018).

O diagnóstico precoce prediz maior sobrevida e melhor prognóstico. Sendo assim, um diagnóstico eficiente e rápido é uma prioridade entre a comunidade médica e científica. Para isso, a exploração contínua de biomarcadores precisos e eficazes, além de uma compreensão mais apurada da fisiopatologia do MC, é fundamental nas pesquisas sobre esse câncer.

Este capítulo tem como objetivo descrever as recentes descobertas sobre o MC e o sistema purinérgico. Inicialmente, exploraremos todas suas características para depois compreendermos os mecanismos fisiopatológicos em que o sistema purinérgico está envolvido no desenvolvimento de um MC.

Melanoma Cutâneo – a doença

Nas escrituras de Hipócrates, surgiu a primeira descrição que faz referência ao MC, durante o período 460 a 375 a.C. Porém, a partir dos anos de 1800, vários avanços foram documentados: Robert Carswell, em 1838, descreveu lesões malignas pigmentadas da pele; em 1858, Pemberton realizava a excisão ampla e profunda como tratamento da doença, além da ressecção em blocos, com margens amplas, segundo recomendado por Handley, em 1907. Após alguns anos, nas décadas de 50 e 60, vários pesquisadores – Allen, Spitz, Petersen e Bodenhan – já tentavam identificar os fatores prognósticos relacionados ao melanoma. Mas somente em 1969, Clark e colaboradores aprimoraram o sistema de microestadiamento, utilizando como critério os níveis de invasão da pele; em seguida, Breslow demonstrou a importância da espessura do melanoma primário. Finalmente, em 1992, Morton introduziu o rastreamento linfático pré-operatório e a linfadenectomia seletiva do(s) linfonodo(s) marcado(s) (Wainstein, Belfort, 2004).

O MC forma-se a partir da transformação maligna dos melanócitos (células produtoras de melanina) e envolve principalmente fatores ambientais e genéticos. Desenvolve-se a partir de melanócitos da epiderme, porém, tumores primários também podem ser encontrados revestindo a camada coroidal do olho ou as superfícies mucosas das vias respiratórias, superfícies geniturinárias e gastrointestinais (Valko-Rokytovská *et al.*, 2018).

Os melanócitos são uniformemente localizados na interface da derme e epiderme. Quando encontrados em agrupamentos mais densos, são chamadas de nevo. O MC pode ser resultante da transformação maligna dos melanócitos

em 75% dos casos e de nevos preexistentes em 25% dos casos (Eggermont, Spatz, Robert, 2014).

O pigmento melanina é sintetizado em organelas especiais dos melanócitos, denominadas melanossomas, em uma cascata enzimática envolvendo principalmente a tiroquinase e suas proteínas. Dois tipos de pigmentos são produzidos: o marrom/preto, que exibe características fotoprotetoras; e o laranja/amarelo, que tem fraca propriedade fotoprotetora. A melanina fornece uma eficiente proteção contra os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta, por reduzir o dano causado ao DNA e a instabilidade genômica causados pela radiação (Bandarchi *et al.*, 2010).

A maioria das lesões de um MC possui mutações chamadas de condutoras (ou *driver mutations*), que levam ao desenvolvimento da doença. No geral, podem-se citar as seguintes *driver mutations*: mutação V600E no proto-oncogene B-Raf (BRAF); e a mutação na região promotora da enzima telomerase (TERT), responsável pela evolução de lesão intermediária benigna para melanoma *in situ*. Mutações no gene neuroblastoma *RAS viral oncogene homolog* (NRAS) também levam à evolução de lesões benignas para malignas (Cheng *et al.*, 2018).

Existem alguns fatores de risco associados ao desenvolvimento do MC, além das alterações genéticas: exposição intermitente à radiação UV; número de nevos melanocíticos na pele (>100); cor da pele/olhos/cabelo, de acordo com classificação de Fitzpatrick (Quadro 1); e histórico familiar de câncer e de queimaduras solares, principalmente na infância (Behrens *et al.*, 2018). O uso de camas de bronzeamento também é um fator de risco importante para o seu desenvolvimento, bem como mutações nos genes *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A), *Cyclin-dependent kinase 4* (CDK4), BRAF e Receptor de melanocortina 1 (MC1R) (Shain *et al.*, 2015; Callahan, Flaherty, Postow, 2016) .

Conforme a quantidade de melanina na pele, os pacientes são divididos em seis fototipos diferentes, segundo classificação de Fitzpatrick (Fitzpatrick, Mosher, 2000). Conforme o fototipo, terão mais ou menos chances de desenvolver MC (Quadro 1).

Quadro 1: Fototipos de pele, segundo classificação de Fitzpatrick

	Fototipo I	Fototipo II	Fototipo III	Fototipo IV	Fototipo V	Fototipo VI
Fototipo (pele)	Branca	Branca	Morena Clara	Morena Moderada	Morena escura	Negra
Sensibilidade ao sol	Muito sensível	Sensível	Normal	Normal	Pouco sensível	Insensível
Características	Queima com facilidade e nunca bronzeia	Queima com facilidade e bronzeia pouco	Queima e bronzeia moderadamente	Queima pouco e bronzeia com facilidade	Queima raramente e bronzeia bastante	Nunca queima. Pele totalmente pigmentada

Fonte: Fitzpatrick, Mosher (2000) – adaptado.

MC malignos típicos geralmente apresentam-se assimétricos, com irregularidades da borda, variação de cor e diâmetro superior a 6 mm^3. No entanto, muitas exceções e variações podem ocorrer (Bandarchi *et al.*, 2010). Algumas alterações, tais como novos sinais ou manchas, mudança de cor, tamanho e forma de lesões já existentes, são possíveis sinais ou sintomas importantes para diagnóstico de MC. Com base nessas alterações, foram criados os critérios ABCDE, que orientam algumas alterações possíveis de ser um melanoma (Valko-Rokytovská *et al.*, 2018):

A. Assimetria;
B. Bordas (irregulares);
C. Cor (variação ou vários tons na mesma lesão);
D. Diâmetro (mais de 6 mm de diâmetro);
E. Evolução.

Classificação dos diferentes tipos de melanoma

A classificação do melanoma baseia-se nos padrões microscópicos de crescimento e está associada às características clínicas, tais como localização anatômica do tumor primário e idade do paciente (Clark *et al.*, 1969).

Melanoma Extensivo Superficial (MES) é o subtipo mais frequente que tende a ocorrer na pele e se caracteriza por uma fase de crescimento radial. Fatores importantes da sua etiologia variam de exposição solar aguda na infância a exposição

intermitente na vida adulta. Comumente observado nas pernas, em mulheres, e no tronco, em homens (Battisti *et al.*, 2009; Eggermont, Spatz, Robert, 2014).

Melanoma Lentigo Maligno (MLM) é uma forma de melanoma que ocorre na pele de idosos em regiões cronicamente expostas ao sol, principalmente na face, cuja lesão está associada à atrofia epidérmica e elastose solar (Callahan, Flaherty, Postow, 2016).

Melanoma Lentiginoso Acral (MLA) é um subtipo de melanoma cutâneo com características histopatológicas bem distintas e acomete as palmas das mãos, plantas dos pés e regiões subungueais. Sua incidência é de até 80% na população negra, e 77% na população asiática (Callahan, Flaherty, Postow, 2016).

Além dessas formas clássicas de melanoma, há ainda formas mais raras, como o melanoma de mucosas, ocular, desmoplásicos, associados a nevos congênitos, infantil, nevóide, persistente e associado a nevo azul (Eggermont, Spatz, Robert, 2014; O'Sullivan, O'Connor, 2018).

Diferenciar os vários estágios do MC, bem como seus subtipos, tem um papel fundamental em termos de prognóstico e tratamento. A portaria nº 357, de 8 de abril de 2013 (Ministério da Saúde, 2013), estabelece suas diretrizes diagnósticas e terapêuticas. Avaliar a profundidade (invasão) de um MC pode ser determinado de duas maneiras: pelo índice de Breslow (que avalia a profundidade do tumor em milímetros) e pelo nível de Clark (que descreve a invasão neoplásica em cinco níveis em relação às camadas da pele):

- Nível I: o tumor envolve somente a epiderme;
- Nível II: o tumor envolve a epiderme e parte da derme papilar;
- Nível III: o tumor preenche a derme papilar;
- Nível IV: o tumor envolve a derme reticular;
- Nível V: o tumor invade as camadas de gordura da pele – a hipoderme.

A determinação da espessura do tumor foi introduzida pela primeira vez por Breslow em 1970 (Garbe, Leiter, 2009) e logo foi utilizado como um ótimo recurso de prognóstico para MC. Pacientes com tumores mais finos do que 0,76 milímetros (mm) foram designados como pacientes de baixo risco, pois raramente vão gerar metástase. Pacientes de risco intermediário apresentam espessura de 0,76 até 1,5 mm; de alto risco, de 1,5 até 4,0 mm. Para pacientes com tumores mais espessos que 4,0 mm, o risco de gerar metástase é altíssimo (Garbe *et al.*, 2011).

Nas fases iniciais de um MC, o tratamento é cirúrgico, e o prognóstico é favorável, enquanto que, para estágios mais avançados, a literatura demonstra

benefícios na sobrevida global em pacientes submetidos à ressecção completa, embora muitos pacientes não são elegíveis à cirurgia, quer pelo estado geral e/ou por comorbidades associadas (O'Sullivan, O'Connor, 2018).

O tratamento inicia-se pela ressecção com margens amplas do tumor, que pode ser curativa se a doença estiver localizada. Em lesões de maior espessura, há maiores chances de envolvimento ganglionar, sendo que a remoção de toda a cadeia linfática torna-se necessária para complementar o tratamento desses pacientes (Callahan, Flaherty, Postow, 2016).

A biópsia do linfonodo sentinela (BLS) é o procedimento cirúrgico no qual o linfonodo sentinela (o primeiro linfonodo drenado que pode ser afetado por metástase da doença) é removido e investigado quanto à presença de células cancerígenas. O BLS foi desenvolvido com o objetivo de identificar metástases precoces em linfonodos regionais e selecionar apenas pacientes com metástases nodais para realizar dissecção completa dos linfonodos e evitar isso em pacientes sem metástases nodais. O linfonodo sentinela (LS) é identificado por meio de linfocintilografia (Masoud *et al.*, 2018; Falk Delgado, Zommorodi, Falk Delgado, 2019).

Pacientes nos primeiros estágios de invasão podem normalmente ser curados com a excisão cirúrgica. Sua taxa de sobrevida em 5 anos varia de 90% a 100%. No entanto, o prognóstico piora quanto mais profunda a lesão se estender, devido à maior propensão à metástase. Aproximadamente 3% dos pacientes desenvolverão um segundo MC em um período de três anos. O risco aumenta em pacientes com histórico familiar, chegando a 33% de incidência de um segundo tumor num período de até cinco anos (Enninga *et al.*, 2017).

O MC desencadeia uma série de mudanças patofisiológicas, sendo que as células tumorais interagem com todos os componentes celulares. Nessa interação, células tumorais e células saudáveis têm sido associadas a passos-chave na progressão de cânceres (Bambace, Holmes, 2011) pela ativação de alguns mecanismos. Dentre tais mecanismos, pode-se citar a liberação extracelular de nucleotídeos de purina, como trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) e o nucleosídeo adenosina. Tais moléculas fazem parte de um sistema de sinalização purinérgica e desempenham funções no controle da inflamação e da homeostase dos tecidos, através de seus receptores e enzimas (Stagg, Smyth, 2010; Burnstock, 2015, 2016b)

Sistema purinérgico e melanoma

Após a importante descoberta, em 1929, por Drury e Szent-Györgyi, as purinas extracelulares foram e estão sendo exaustivamente estudadas, em virtude de suas funções como mensageiros extracelulares, capazes de sinalizar uma série de efeitos biológicos e patológicos (Di Virgilio; Adinolfi, 2017).

Os nucleotídeos e o nucleosídeo de adenina interagem com receptores purinérgicos (P1 e P2) específicos, mediando eventos de resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, dentre outros (Burnstock, 2016a).

Alguns subtipos de receptores P2 (P2Y1, P2Y2, P2Y11, P2X5 e o P2X7) têm sido implicados no envolvimento com o câncer: modulação da proliferação de células – receptores P2Y1 e P2Y2 – estimulação da diferenciação com a subsequente inibição da proliferação – receptores P2X5 e P2Y11 – ou indução da morte celular (apoptose) – receptores P2X7 (Burnstock, 2007; Stagg, Smyth, 2010).

Em queratinócitos epidérmicos humanos saudáveis, foram identificados muitos receptores, dentre eles, P2X5, P2X7, P2Y1 e P2Y2, envolvidos na proliferação, diferenciação e morte celular por apoptose (Burnstock, 2016c). Especificamente em melanomas, a função dos receptores P2Y é regular a proliferação celular. Já os receptores P2Y1 ativados causam uma diminuição no número de células, enquanto os receptores P2Y2 ativados causam um aumento no número de células nesse câncer. Receptores P2Y6 também estão presentes no MC, mas foi demonstrado não ter um efeito sobre o número de células, sugerindo-se, então, que eles podem estar desempenhando outro papel na regulação celular (Adinolfi *et al.*, 2010; Di Virgilio, Adinolfi, 2017).

As moléculas que agem sobre esses receptores – ATP/ADP/AMP e adenosina – possuem diferentes funções na fisiopatologia do melanoma, o que será abordado na sequência.

Ectoenzimas

Os efeitos dos nucleotídeos e nucleosídeo extracelulares de adenosina são controlados pela sua rápida hidrólise. A ação catalítica das enzimas denominadas ectonucleotidases tem um importante papel no MC por regular os níveis de ATP (pró-inflamatório) e de adenosina (imunossupressora) (Umansky *et al.*, 2014).

Além de regular a concentração de ATP e adenosina, alguns estudos mostram que a alteração da atividade das ectonucleotidases e da Adenosina Desaminase (ADA) estão diretamente ligadas à capacidade de melanomas invadir e metastatizar (Antonioli *et al.*, 2013; Manica *et al.*, 2018).

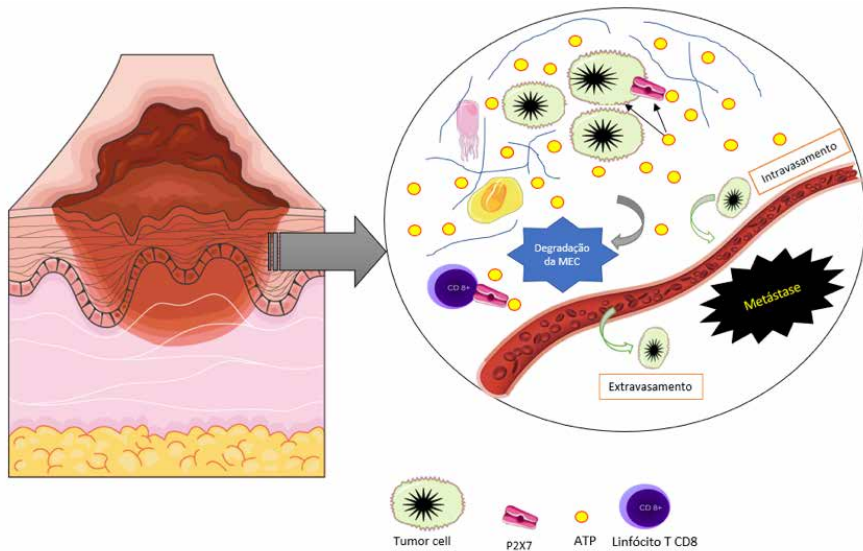
As ectonucleotidases incluem Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase (E-NTPDases), E-5'-Nucleotidase, Ecto-Nucleotídeo Pirofosfato/Fosfodiesterase (E-NPP) e a Fosfatase alcalina (FAL) (Zimmermann, 2001, 2016; Cardoso *et al.*, 2015). A E-NPP hidrolisa o ATP a AMP diretamente; já a E-NTPDase hidrolisa ATP para ADP bem como ADP para AMP. A E-5'-Nucleotidase hidrolisa o AMP a adenosina (Zimmermann, 2001, 2016). O nucleosídeo adenosina é então convertido pela enzima ADA em inosina e hipoxantinas (Antonioli *et al.*, 2012; Bach *et al.*, 2013). Em conjunto, essas enzimas descritas anteriormente são capazes de regular a concentração extracelular dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, sendo importante sinalizadores dos eventos pró-inflamatórios, anti-inflamatórios e tumorais.

Nucleotídeos extracelulares

Os nucleotídeos são os constituintes dos ácidos nucléicos. Além de representarem o armazenamento de energia da célula, estão envolvidos na sinalização intracelular e na comunicação célula a célula. O ATP extracelular está em concentração consideravelmente menor quando comparado aos seus níveis no citoplasma (cerca de 1000 vezes maior no citoplasma). O aumento da concentração de ATP no meio extracelular é associado com estresse ou dano tecidual, pois pode ser rapidamente liberado junto com outros componentes celulares após estresse mecânico, dano celular ou morte (Vitiello *et al.*, 2012; Di Virgilio *et al.*, 2018).

A liberação do ATP para o espaço extracelular também ocorre no câncer e está envolvida com a imunidade antitumoral. Sua acumulação no espaço extracelular terá efeito positivo ou negativo dependendo da sua concentração, taxa de degradação e a expressão dos receptores P2 pelas células cancerígenas e pelas células inflamatórias infiltrantes. Estudos recentes mostraram que o ATP extracelular é um importante modulador imunológico (Di Virgilio, Adinolfi, 2017; Manica *et al.*, 2018).

O ATP liberado em um meio com células tumorais acumula-se em grandes concentrações extracelularmente e, além de atuar como sinal de perigo, também pode matar as células tumorais adjacentes via ligação aos receptores P2X7 (Figura 1) (Stagg, Smyth, 2010; Jiang, Riquelme, Zhou, 2015; De Ita *et al.*, 2016).

Figura 1. Efeitos do ATP extracelular no desenvolvimento e evolução de um MC

Fonte: autores (2019).

* O aumento das concentrações de ATP extracelular desencadeia uma série de efeitos no microambiente tumoral: ligação através de receptores P2X7 em células tumorais, macrófagos e linfócitos T, aumento da degradação da matriz extracelular, facilita e suporta a invasão de células tumorais, a migração através das paredes dos vasos e a entrada na circulação (intravasamento). No espaço extravascular, as células cancerígenas encontram um ambiente inflamatório adequado para a colonização – metástase.

Em cultura de células de melanoma, observaram-se diferentes efeitos do ATP. Quando se utilizou uma linhagem celular de melanoma geneticamente modificada, o ATP exibiu efeito antitumoral, que pode ser amplificado pela inibição da enzima E-NTPDase (CD39) (Yegutkin *et al.*, 2011). Já a liberação do

ATP extracelular pelas células tumorais de uma linhagem de melanoma (B16) contribuiu para o recrutamento e a estimulação de células T reguladoras, resultando em um ambiente imunossupressor (Ring, Enk, Mahnke, 2011).

A agregação plaquetária induzida por células tumorais é um passo indispensável para a metástase hematogênica. O principal metabólito do ATP – o ADP – está intimamente relacionado com essa interação plaqueta-tumor. A capacidade das células tumorais em induzirem a agregação plaquetária acontece por meio de vias que envolvem a geração principalmente de ADP. O receptor de uroquinase e a integrina vitronectina, ou αvβ3, induz a quimiotaxia e a reorganização do citoesqueleto celular por meio de diferentes vias de sinalização A ligação de ADP em receptores αvβ3, presentes em células de melanoma e em plaquetas, possibilita interações entre tais células e, consequentemente, crescimento tumoral e metástases. (Bambace, Holmes, 2011; Burnstock, 2015).

O ADP, além de ser importante na indução de agregação plaquetária e tumoral, também foi relatado ser produzido em maior quantidade por células de melanoma humano derivadas de biópsias de linfonodos do que em células removidas de melanomas primários (Bandarchi *et al.*, 2010). Ao ser hidrolisado pela CD39, o ADP transforma-se em AMP. Alguns estudos sugerem que o AMP pode influenciar no ciclo celular de tumores (Antonioli *et al.*, 2013; De Ita *et al.*, 2016). Porém, em melanomas, seu principal efeito provém de seu metabólito adenosina.

Adenosina

Em um estado de homeostase, a adenosina exibe funções citoprotetoras: estimulação da angiogênese e inibição das reações inflamatórias locais. No ambiente tumoral, invertem-se as funções, e ela proporciona um ambiente favorável para o seu crescimento acelerado (Ghiringhelli *et al.*, 2012).

A adenosina é um nucleosídeo purínico produzido via hidrólise enzimática do AMP pela E-5'Nucleotidase (CD73), localizada na superfície celular (Umansky *et al.*, 2014). Sua atividade no crescimento celular, apoptose, proliferação celular, angiogênese e resposta imune em diferentes tipos de câncer, realiza-se pela interação com receptores específicos acoplados à proteína G – A1, A2A, A2B e A3 (Bahreyni *et al.*, 2018). Suas concentrações, tanto intracelulares quanto extracelulares, são controladas pela atividade da enzima ADA (Galore-Haskel *et al.*, 2015).

As células de MC possuem receptor para adenosina. O receptor A1 aumenta significativamente a quimiotaxia e motilidade de células de melanoma e a infiltração tumoral de macrófagos. Os receptores A2, por sua vez, estimulam a proliferação celular, a angiogênese e a metástase. O receptor A3 está superexpresso em células de melanoma e regula a melanomagênese, por estimular o crescimento tumoral. Devido a seus efeitos no MC, alguns antagonistas de receptor A3 estão sendo estudados como agentes para diminuir a produção de citocinas inflamatórias induzidas pela quimioterapia em pacientes com MC (Bahreyni *et al.*, 2018).

Dentre os antagonistas de receptores A3, podem ser citados os derivados de flavonoides, derivados da 1,4-di-hidropiridina, da piridina e da pirimidina, derivados da triazoloquinazolina, derivados da isoquinolina e quinazolina e, derivados da pirazoloquinolina, triazoloquinoxalina e pirazolotriazolopirimidina (Falk Delgado, Zommorodi, 2019).

Sabendo-se que a adenosina tem efeitos deletérios no MC e que se visualiza um aumento de novos casos anualmente, destaca-se a necessidade de maiores estudos para revelar mecanismos da via da adenosina no MC. Esses estudos são essenciais para o diagnóstico e desenvolvimento de novos agentes agonistas ou antagonistas, avançando os procedimentos terapêuticos e obtendo maior significado clínico em termos de tratamento para complicações associadas ao câncer (Bahreyni *et al.*, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O MC é uma forma agressiva de câncer de pele e é uma das principais causas de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo. Dentre os mecanismos implicados na fisiopatologia do MC, podem ser citados os componentes da via de sinalização purinérgica, incluindo enzimas, receptores e seus agonistas/antagonistas, os quais são importantes na regulação da proliferação, no crescimento, na invasão e motilidade de células de melanoma. Em vista de tal envolvimento, constituintes do sistema purinérgico tornam-se um alvo terapêutico promissor para futuras opções de tratamento.

No Brasil, até o momento, não existem estudos clínicos cadastrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que envolvam moléculas do sistema purinérgico e melanomas, porém estão sendo desenvolvidos vários estudos pré-clínicos. Dentre eles, pode-se citar alguns mais recentes:

- Adenosina produzida pelas ectonucleotidases contribuindo para a progressão do melanoma (Bahreyni *et al.*, 2018; Young *et al.*, 2018);
- CD73 como alvo terapêutico promissor e biomarcador prognóstico desfavorável (Morello *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018; Passarelli *et al.*, 2019);
- Potenciais estratégias terapêuticas baseadas no controle da sinalização de receptores de adenosina, CD39, CD73 e suas moléculas (Manica *et al.*, 2018; Gilbert *et al.*, 2019; Mânica *et al.*, 2019).

REFERÊNCIAS

ADINOLFI, E. *et al.* Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. The FASEB Journal, v. 24, n. 9, p. 3393-3404, set. 2010.

ANTONIOLI, L. *et al.* Adenosine Deaminase in the Modulation of Immune System and its Potential as a Novel Target for Treatment of Inflammatory Disorders. Current Drug Targets, v. 13, n. 6, p. 842-862, 2012.

ANTONIOLI, L. *et al.* CD39 and CD73 in immunity and inflammation. Trends in Molecular Medicine, v. 19, n. 6, p. 355-367, 2013.

BACH, B. C. *et al.* E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy. Cell Biochemistry and Function, v. 31, n. 6, p. 476-481, 2013.

BAHREYNI, A. *et al.* The potential role of adenosine signaling in the pathogenesis of melanoma. Biochemical Pharmacology, v. 156, p. 451-457, out. 2018.

BAMBACE, N. M.; HOLMES, C. E. The platelet contribution to cancer progression. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 9, n. 2, p. 237-249, 2011.

BANDARCHI, B. *et al.* From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. Dermatology Research and Practice, v. 2010, n. 1, p. 1-8, 2010.

BATTISTI, R. *et al.* Avaliação do perfil epidemiológico e da mortalidade dos pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo primário no município de Florianópolis – SC, Brasil. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 84, n. 4, p. 335-342, ago. 2009.

BEHRENS, G. *et al.* Physical activity, cardiorespiratory fitness and risk of cutaneous malignant melanoma: Systematic review and meta-analysis. PLOS ONE, v. 13, n. 10, p. e0206087, 31 out. 2018.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 64, n. 12, p. 1471-1483, 2007.

BURNSTOCK, G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling. Purinergic Signalling, v. 11, n. 4, p. 411-434, 2015.

BURNSTOCK, G. An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. Neuropharmacology, v. 104, n. June, p. 4-17, 2016a.

BURNSTOCK, G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 371, n. 1700, p. 20150422, 5 ago. 2016b.

BURNSTOCK, G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 371, n. 1700, p. 20150422, 5 ago. 2016c.

CALLAHAN, M. K.; FLAHERTY, C. R.; POSTOW, M. A. Melanoma. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 167

CARDOSO, A. M. *et al.* Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. Autonomic Neuroscience, v. 191, p. 25-38, set. 2015.

CHENG, L. *et al.* Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. Modern Pathology, v. 31, n. 1, p. 24-38, 17 jan. 2018.

CLARK, WALLACE H.; JR., LYNN FROM, EVELINA A. BERNARDINO, AND M. C. M. D. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. CANCER RESEARCH, v. 29, n. 1, p. 705-726, 25 fev. 1969.

DE ITA, M. *et al.* ATP releases ATP or other nucleotides from human peripheral blood leukocytes through purinergic P2 receptors. Life Sciences, v. 145, p. 85-92, 2016.

DI VIRGILIO, F. *et al.* Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. Nature Reviews Cancer, p. 1-18, 13 jul. 2018.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. Oncogene, v. 36, n. 3, p. 293-303, 2017.

EGGERMONT, A. M. M.; SPATZ, A.; ROBERT, C. Cutaneous melanoma. The Lancet, v. 383, n. 9919, p. 816-827, mar. 2014.

ENNINGA, E. A. L. *et al.* Survival of cutaneous melanoma based on sex, age, and stage in the United States, 1992-2011. Cancer Medicine, v. 6, n. 10, p. 2203-2212, out. 2017.

FALK DELGADO, A.; ZOMMORODI, S.; FALK DELGADO, A. Sentinel Lymph Node Biopsy and Complete Lymph Node Dissection for Melanoma. Current Oncology Reports, v. 21, n. 6, p. 54, 26 jun. 2019.

FILIPP, F. V. *et al.* Frontiers in pigment cell and melanoma research. Pigment Cell & Melanoma Research, v. 31, n. 6, p. 728-735, nov. 2018.

FITZPATRICK, T. B.; MOSHER, D. B. Pigmentação cutânea e distúrbiodo metabolismo da melanina. *In*: Medicina interna. [s.l: s.n.]. p. 276-284.

GALORE-HASKEL, G. *et al.* A novel immune resistance mechanism of melanoma cells controlled by the ADAR1 enzyme. Oncotarget, v. 6, n. 30, p. 28999-9015, 2015.

GARBE, C. *et al.* Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects. The Oncologist, v. 16, n. 1, p. 5-24, 1 jan. 2011.

GARBE, C.; LEITER, U. Melanoma epidemiology and trends. Clinics in Dermatology, v. 27, n. 1, p. 3-9, jan. 2009.

GHIRINGHELLI, F. *et al.* Production of adenosine by ectonucleotidases: A key factor in tumor immunoescape. Journal of Biomedicine and Biotechnology, v. 2012, 2012.

GILBERT, S. *et al.* ATP in the tumour microenvironment drives expression of nfP2X 7 , a key mediator of cancer cell survival. Oncogene, v. 38, n. 2, p. 194-208, 2019.

JIANG, J. X.; RIQUELME, M. A.; ZHOU, J. Z. ATP , a double-edged sword in cancer. Oncoscience, v. 2, n. 8, p. 673-674, 2015.

MANICA, A. *et al.* High levels of extracellular ATP lead to chronic inflammatory response in melanoma patients. Journal of Cellular Biochemistry, v. 119, n. 5, p. 3980-3988, 2018.

MÂNICA, A. *et al.* The signaling effects of ATP on melanoma-like skin cancer. Cellular Signalling, v. 59, n. January, p. 122-130, 2019.

MASOUD, S. J. *et al.* Sentinel Lymph Node Biopsy and Completion Lymph Node Dissection for Melanoma. Current Treatment Options in Oncology, v. 19, n. 11, 2018.

MILAC, A. L.; NEGROIU, G. The Multiple Roles of Tyrosinase-Related Protein-2/L- Dopachrome Tautomerase in Melanoma: Biomarker, Therapeutic Target, and Molecular Driver in Tumor Progression. *In*: Human Skin Cancers – Pathways, Mechanisms, Targets and Treatments. [s.l.] InTech, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA No 357, DE 8 DE ABRIL DE 2013. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno Cutâneo. Anais...2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357_08_04_2013.html

MONTEIRO, I. *et al.* CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma. Oncotarget, v. 9, n. 42, p. 26659-26669, 2018.

MORELLO, S. *et al.* Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab. Journal of Translational Medicine, v. 15, n. 1, p. 244, 4 dez. 2017.

O'SULLIVAN, J.; O'CONNOR, D. The Modern Approach to Targeting Melanoma. *In*: Human Skin Cancers – Pathways, Mechanisms, Targets and Treatments. [s.l.] InTech, 2018.

PASSARELLI, A. *et al.* The metabolic milieu in melanoma: Role of immune suppression by CD73/adenosine. Tumor Biology, v. 41, n. 4, p. 101042831983713, 8 abr. 2019.

PASTUSHENKO, I. *et al.* Mechanisms of tumour vascularization in cutaneous malignant melanoma: clinical implications. The British journal of dermatology, v. 171, n. 2, p. 220-233, 2014.

PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; JUNG, S.-H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. Cellular Signalling, v. 40, p. 99-115, dez. 2017.

RING, S.; ENK, A. H.; MAHNKE, K. Regulatory T Cells from IL-10-Deficient Mice Fail to Suppress Contact Hypersensitivity Reactions Due to Lack of Adenosine Production. Journal of Investigative Dermatology, v. 131, n. 7, p. 1494-1502, jul. 2011.

SHAIN, A. H. *et al.* The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. New England Journal of Medicine, v. 373, n. 20, p. 1926-1936, 12 nov. 2015.

STAGG, J.; SMYTH, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. Oncogene, v. 29, n. 39, p. 5346-5358, 2010.

UMANSKY, V. *et al.* Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. Cancer Immunology, Immunotherapy, v. 63, n. 10, p. 1073-1080, 23 out. 2014.

VALKO-ROKYTOVSKÁ, M. *et al.* Possibilities for the Therapy of Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. *In*: Human Skin Cancers – Pathways, Mechanisms, Targets and Treatments. [s.l.] InTech, 2018.

VITIELLO, L. *et al.* Immunoregulation through extracellular nucleotides. Blood, v. 120, n. 3, p. 511-518, 19 jul. 2012.

WAINSTEIN, A. J. A.; BELFORT, F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, v. 31, n. 3, p. 204-214, jun. 2004.

YEGUTKIN, G. G. *et al.* Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. European Journal of Immunology, v. 41, n. 5, p. 1231-1241, maio 2011.

YOUNG, A. *et al.* A2AR adenosine signaling suppresses natural killer cell maturation in the tumor microenvironment. Cancer Research, v. 78, n. 4, p. 1003-1016, 2018.

ZHENG, Y. J.; TRASPAS, R. M.; ORTIZ-URDA, S. LncRNAs as Biomarkers for Melanoma. Human Skin Cancers – Pathways, Mechanisms, Targets and Treatments, 2018.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases : Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. Drug Development Research, v. 52, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H. Extracellular ATP and other nucleotides-ubiquitous triggers of intercellular messenger release. Purinergic Signalling, v. 12, n. 1, p. 25-57, 2016.

CÂNCER DE PULMÃO E SISTEMA PURINÉRGICO

Gabriela Matschinski
Tamíres Mittelmann
Daniela Zanini

INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão representa um importante problema de saúde pública de ordem mundial, uma vez que a doença atingiu um contingente de mais de dois milhões de novos casos no ano de 2018, registrando a maior letalidade entre as doenças neoplásicas (Torre *et al.*, 2015; Bray *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o diagnóstico tardio das neoplasias de pulmão é um agravante, já que, na maioria dos pacientes, se diagnostica a doença em fases avançadas, tornando os quadros clínicos cada vez mais complexos e piorando o prognóstico (Evans, 2013). Embora possam ter diversas causas, a incidência e a letalidade do câncer de pulmão estão intimamente relacionadas com o tabagismo, que é o principal fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de neoplasia (Torre *et al.*, 2015; Didkowska *et al.*, 2016; Bray *et al.*, 2018).

O processo patológico inicia-se através de injúrias teciduais promovidas por agentes químicos, físicos ou biológicos, que ocasionam processos inflamatórios, culminando em eventos lesivos ao DNA (Balani; Nguyen; Eaves, 2017). É nesse cenário que o sistema purinérgico desempenha importante papel de sinalização, tanto no desenvolvimento quanto na progressão tumoral, uma vez que

está envolvido em processos como sobrevivência celular, modulação da resposta imune e tromborregulação (Pasternak, 2002; Song *et al.*, 2016).

Estudos recentes têm evidenciado um aumento do trifosfato de adenosina (ATP) extracelular no microambiente tumoral, bem como uma alteração na expressão dos receptores purinérgicos P1 e P2 entre as células de câncer de pulmão e as células normais (Schneider *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2016). Ademais, o sistema enzimático purinérgico, que contribui para a geração de nucleotídeos, também exerce marcada influência na progressão do tumor em pacientes com câncer de pulmão e, por conta disso, mudanças na expressão dessas enzimas podem indicar um mau prognóstico para o paciente (Zanini *et al.*, 2012; Schmid *et al.*, 2015; Inoue *et al.*, 2017).

Além disso, evidências apontam que a modulação dos componentes do sistema purinérgico pode atuar como um sistema promissor no âmbito terapêutico antitumoral, melhorando os índices de sobrevida – até então muito baixos – e contribuindo para a melhora da qualidade de vida da população atingida (Rao *et al.*, 2014; Takai *et al.*, 2014; Schneider *et al.*, 2015; Burnstock; Knight, 2017; Inoue *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Dessa forma, a modulação da sinalização purinérgica, através do bloqueio de receptores e da alteração da atividade das enzimas, bem como a inibição dos efeitos pró-metastáticos dos nucleotídeos, pode colaborar no controle do desenvolvimento e da progressão, além de representar novas opções terapêuticas para os pacientes com câncer de pulmão.

Câncer de pulmão: epidemiologia

O câncer de pulmão apresenta-se como uma patologia extremamente letal, sendo a principal causa de morte relacionada ao câncer entre homens e a segunda entre mulheres, além de que, entre todos os tipos de neoplasias, 18,4% dos óbitos decorrem do câncer de pulmão (Bray *et al.*, 2018).

Estudos recentes têm revelado um aumento de 12,5% nas taxas de mortalidade causadas por neoplasias de pulmão na população entre os anos de 2012 e 2018 (Didkowska *et al.*, 2016; Bray *et al.*, 2018). Apesar de estarem decrescendo essas taxas entre homens nos países desenvolvidos, em virtude de uma diminuição do hábito do tabagismo nesse grupo, os índices de mortalidade por câncer

de pulmão continuam crescentes entre as mulheres, já que nessa população o hábito de fumar se estabeleceu mais tardiamente. Vale ressaltar que, em algumas regiões da Ásia e África, nas quais a epidemia do tabaco é mais recente ou não se consolidou, os elevados índices de mortalidade por câncer de pulmão poderiam ser prevenidos (Torre *et al.*, 2015b; Bray *et al.*, 2018).

Em relação à incidência de tumores, o câncer de pulmão corresponde à neoplasia maligna mais diagnosticada, atingindo índices de 11,6% do total dos diagnósticos (Bray *et al.*, 2018). De acordo com os dados do GLOBOCAN, o número de novos casos de câncer de pulmão para o ano de 2018 foi de 2,1 milhões, com maiores taxas nos países desenvolvidos. Entre os homens, as maiores incidências são visualizadas na Turquia, nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa Oriental; entre as mulheres, a maioria dos diagnósticos concentra-se na América do Norte e em países do norte europeu (Torre *et al.*, 2015; Didkowska *et al.*, 2016; Bray *et al.*, 2018).

Nesse ponto, vale destacar que, indiscutivelmente, o tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão (Brawley *et al.*, 2013). Por essa razão, as neoplasias pulmonares podem ser prevenidas desde que ações como a diminuição da prevalência do tabagismo entre a população, através da inibição de novos consumidores e do abandono do tabagismo entre os fumantes atuais, sejam adotadas (Torre *et al.*, 2015; Didkowska *et al.*, 2016; Bray *et al.*, 2018). Entretanto, de acordo com Bilano e colaboradores (2015), a perspectiva para o uso de tabaco em 2025 não é animadora. Segundo os autores, muitos países não estão em vias de alcançar as metas para redução do consumo de cigarros pela população, além de que vários países de baixa e média renda tendem a enfrentar uma piora das epidemias de indivíduos tabagistas.

Sendo assim, a fim de que a prevalência de tabagistas na população diminua e essa previsão suscitada não se confirme, é necessário instituir programas eficazes para o controle do tabagismo, os quais perpassam: a) aumento do preço do tabaco, através da maior incidência de carga tributária para esses insumos; b) disponibilidade de tratamento e aconselhamento para os usuários que têm dependência; c) limitação da publicidade e da promoção de incentivo ao consumo do tabaco; e d) alertas à população sobre os riscos vinculados ao tabagismo (Torre *et al.*, 2015; Bray *et al.*, 2018).

Ademais, um dos principais desafios enfrentados no tratamento do câncer de pulmão é o fato do diagnóstico da patologia ocorrer, geralmente, em fases

avançadas da doença, devido à sintomatologia pouco específica e sua manifestação tardia (Evans, 2013). De acordo com Tod e colaboradores (2008), até 80% dos indivíduos com neoplasia pulmonar apresentam-se com estadiamento avançado da doença, comprometendo, desse modo, a instituição e eficiência dos tratamentos curativos.

Esses dados alarmantes em relação à precariedade do diagnóstico do câncer de pulmão podem estar relacionados a múltiplos fatores, como: falta de conhecimento da sintomatologia significativa, tanto por parte dos profissionais da área da saúde quanto por parte da população; falta de clareza sobre o processo de encaminhamento dentro do sistema de saúde; temor de um mau prognóstico para a doença e das limitações que ela possa trazer; e medo da afirmação do diagnóstico de câncer, que permanece como uma sentença de morte do indivíduo perante a sociedade (Macleod *et al.*, 2009; Evans, 2013).

Como referido anteriormente, os sintomas observados em pacientes com câncer de pulmão costumam ser inespecíficos e incluem tosse por mais de três semanas, hemoptise, dor torácica, dispneia, entre outros (Macleod *et al.*, 2009; Evans, 2013). Frente a essa dificuldade para o diagnóstico precoce da malignidade, as taxas de sobrevida em cinco anos para pacientes com câncer de pulmão são extremamente baixas, apresentando-se entre 10 e 20% (Allemani *et al.*, 2015).

Em relação à faixa etária, é incomum a ocorrência de câncer de pulmão em indivíduos abaixo dos 45 anos de idade (2,5% do número de novos casos). Todavia, o risco de desenvolvimento da doença aumenta progressivamente com a idade, sendo as maiores taxas de incidência do câncer de pulmão verificadas em populações que estão acima dos75 anos. Por fim, no que se refere ao sexo, observa-se uma maior prevalência entre os homens (65% em 2018) (Bray *et al.*, 2018).

Classificação das neoplasias pulmonares

Os cânceres que afetam os tecidos pulmonares apresentam-se sob formas distintas, possuindo características que diferem de um tumor para o outro (Youlden *et al.*, 2008). De maneira geral, costumam se originar em células do epitélio alveolar do parênquima pulmonar ou da mucosa da árvore traqueobrônquica (Spencer, 1977; Dunnill, 1982; Askin & Kaufman, 1985). Devido à diversidade em relação à classificação histológica, aos níveis de agressividade e aos protocolos

terapêuticos das neoplasias pulmonares, elas são comumente classificadas em dois grandes grupos: carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC) e carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC) (Youlden *et al.*, 2008).

O CPNPC corresponde a aproximadamente 80% dos diagnósticos e contempla os adenocarcinomas, carcinomas epidermóides e carcinomas de grandes células. Os carcinomas epidermóides costumam se desenvolver em vias aéreas centrais e possuem a capacidade de alcançar grandes tamanhos, enquanto os adenocarcinomas crescem preferencialmente em tecidos periféricos, sendo o subtipo mais encontrado em não fumantes (Youlden *et al.*, 2008). Vale destacar, porém, que, recentemente, a literatura tem evidenciado um aumento na incidência de adenocarcinomas também em indivíduos fumantes, fato que tem sido relacionado ao uso de filtros em cigarros, o que levaria a uma inalação profunda da fumaça com maior alcance de tecidos periféricos (Evans, 2013).

O CPPC apresenta-se como o mais agressivo, possui maior probabilidade de desenvolver metástases do que os demais subtipos histológicos, e a sua ocorrência está intimamente associada com o tabagismo, sendo que 95% dos indivíduos acometidos são fumantes ou ex-fumantes (Youlden *et al.*, 2008; Evans, 2013).

Fisiopatologia do câncer de pulmão

Múltiplos agentes genotóxicos endógenos ou externos ao organismo, de natureza química, física ou biológica, podem afetar a homeostase natural das células. Durante o processo da carcinogênese, esses agentes podem interagir conjuntamente com fatores de susceptibilidade genética, promovendo alterações celulares que possibilitem o desenvolvimento de tumores (Götte; Kovalszky, 2018).

A carcinogênese pulmonar inicia-se por meio da ocorrência de lesões teciduais em virtude, por exemplo, da fumaça do tabaco, de fatores hormonais, de vírus oncogênicos (como o papiloma vírus humano), entre outros. Essas lesões podem favorecer o desenvolvimento de alterações genéticas e epigenéticas, as quais podem incluir mutações, perda da heterozigose e metilação do promotor. Além disso, alterações gerais no transcriptoma, como inflamação e apoptose, também podem ser consequências de tais injúrias. A persistência e a ausência de reparo desses danos podem culminar em células com fenótipo maligno, ou seja,

que perderam a capacidade de responder aos sinais de controle de proliferação, diferenciação e morte celular (Herbst; Heymach; Lippman, 2008).

Ressalta-se, neste momento, que as células constitutivas de uma população tumoral apresentam heterogeneidade entre si, já que elas não costumam apresentar a mesma configuração genética daquelas que lhe deram origem. Essa variabilidade é resultado de um somatório de fatores, como erros normais na replicação do DNA, menor controle da estabilidade do DNA em células tumorais, tecido de origem das células tumorais, idade do indivíduo em questão, bem como o envolvimento de fatores ambientais. Adicionalmente, para que um tumor maligno se desenvolva, é necessário que o indivíduo acumule uma série de mutações e expresse propriedades fenotípicas anormais, uma vez que o câncer só é detectável na presença de milhões ou até bilhões de células malignas, configurando a carcinogênese como um processo de lento desenvolvimento (Balani; Nguyen; Eaves, 2017).

No câncer de pulmão, inicialmente, observam-se lesões pré-malignas, como displasia celular e manchas clonais contendo clones e subclones celulares, que podem apresentar perda da heterozigose, instabilidade de microssatélites e mutações, estas últimas mais comumente encontradas nos genes *TP53*, *KRAS*, *EGFR* e *HER2*. Subsequentemente, na iminência de agravos como desenvolvimento de angiogênese e invasão tecidual, pode-se dizer que há um tumor em estágio inicial instalado e, à medida que ocorre a progressão tumoral, ele também pode enviar metástases para locais distantes – por via linfática ou hematogênica –, configurando o câncer em estágio avançado (Herbst; Heymach; Lippman, 2008).

Considerando que historicamente o tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão, observa-se uma relação dose-resposta entre o nível de exposição ao fumo e a ocorrência de neoplasias pulmonares (Doll; Peto, 1978; Didkowska *et al.*, 2016). Nesse contexto, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de baixo peso molecular encontrados na fumaça do cigarro são possíveis promotores do CPPC, enquanto a exposição do tecido pulmonar periférico às nitrosaminas, encontradas na fumaça do tabaco, está associada ao desenvolvimento de adenocarcinomas de pulmão (Akhtar; Bansal, 2017).

Além dos compostos supracitados, são encontrados no cigarro aminas, amônias, cetonas, cetaldeídos, metais pesados (como níquel, cádmio e chumbo) e alcatrão, todos com potencial carcinogênico (Singhavi *et al.*, 2018). No caso do alcatrão, os agentes genotóxicos presentes são metabolicamente ativados pelo

organismo, através do complexo enzimático P450 e de outras enzimas, como S--transferases, glucuronosil transferases e sulfatases, para então se tornarem carcinogênicos. Os produtos dessas reações enzimáticas formam adutos de DNA, ou seja, danos oxidativos às bases nitrogenadas, que, se não forem removidos por mecanismos de reparo do material genético, podem interagir com oncogenes e genes supressores tumorais, em especial *TP53* e *KRAS*, possibilitando a carcinogênese. Simultaneamente, as espécies reativas do alcatrão, como quinonas, hidroquinonas e semiquinonas, podem criar *nicks* (danos às ligações fosfodiésteres que resultam em descontinuações na estrutura helicoidal da dupla fita) e quebras no DNA, facilitando, dessa forma, a ocorrência de mutações e o desenvolvimento de tumores (Akhtar; Bansal, 2017).

A fisiopatologia do câncer de pulmão está tão correlacionada com o tabagismo que a literatura tem demonstrado que as neoplasias pulmonares em fumantes e em pessoas que nunca fumaram diferem em nível molecular, epigenético e também histológico. De acordo com o relatório de Govindan *et al.* (2012), amostras de tumores de fumantes possuem mais mutações pontuais do que amostras de tumores de não fumantes; os pesquisadores também relataram que a frequência de mutação é 10 vezes maior em indivíduos tabagistas do que naqueles não tabagistas. Esses achados sugerem, então, que o câncer de pulmão em pessoas que nunca fumaram tem uma via de carcinogênese diferente da dos fumantes (Akhtar; Bansal, 2017).

Apesar de o tabaco ser a principal causa, outros fatores também estão associados com o aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias pulmonares. A poluição ambiental, a exposição a carcinógenos industriais (como amianto, sílica, arsênico e gás radônio), a exposição a altas doses de radiação, a presença de doenças pulmonares preexistentes (como tuberculose, pneumonia e infecções virais), os níveis hormonais de estrogênio, os hábitos alimentares, a obesidade, os fatores genéticos e o histórico familiar desempenham um papel cada vez mais importante no desenvolvimento do câncer de pulmão, independentemente ou através de efeitos aditivos ou multiplicativos (Youlden *et al.*, 2008; Akhtar; Bansal, 2017).

Além da classificação histológica, o câncer de pulmão também é ordenado com base nas mutações evidenciadas em nível molecular e, dessa forma, a doença é dividida em subtipos moleculares primários e secundários. Os subtipos moleculares primários do câncer de pulmão estão relacionados a mutações diretas, especialmente nos genes *EGFR*, *KRAS* e oncogene *EML4-ALK*. Já os subtipos

moleculares secundários compreendem outras modificações gênicas como amplificações do gene *PI3KCA*, superexpressão dos genes *c-MET* e *VEGFR*, deleção do gene *PTEN*, metilação e translocação do gene *ROS1*, além de alterações epigenéticas e relacionadas ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (West *et al.*, 2012). Nesse contexto, o único lócus que tem sido consistentemente replicado em todos os tipos de câncer de pulmão, independentemente do tipo histológico, é o 15q25 (MALHOTRA *et al.*, 2016), sendo frequente a ocorrência de transições e transversões no gene supressor de tumor *TP53* (Akhtar; Bansal, 2017). Ainda foram encontradas, em fumantes, mutações no códon 12 do gene *KRAS*, que levam ao desenvolvimento de câncer de pulmão (Akhtar; Bansal, 2017).

Em relação aos tipos histológicos e às alterações genéticas encontradas, estudo mostra que ambos os genes, *TP53* e *RB1*, são universalmente perdidos em todos os CPPC e são frequentemente perdidos nos CPNPC, além das mutações no oncogene *KRAS* serem comuns em adenocarcinomas pulmonares, pouco comuns em tumores escamosos e ausentes em CPPC (Gridelli *et al.*, 2015).

Visto isso, é notório que existem complexas interações entre o ambiente e a suscetibilidade genética do hospedeiro no que diz respeito à origem molecular do câncer de pulmão. Esssa patologia evolui, portanto, por meio de alterações genéticas e epigenéticas, incluindo vias de sinalização desreguladas, que são alvos potenciais para quimioprevenção e terapia (Herbst; Heymach; Lippman, 2008).

Envolvimento do sistema purinérgico no câncer de pulmão

É indiscutível o papel importante dos nucleotídeos de adenina, tais como ATP e ADP, e do seu nucleosídeo correspondente – a adenosina – como sinalizadores extracelulares em processos de proliferação, diferenciação e apoptose celular, fundamentais no desenvolvimento e progressão tumoral (White; Burnstock, 2006).

Naturalmente, os nucleotídeos se encontram em baixas quantidades no líquido extracelular (White; Burnstock, 2006). Nesse contexto, várias enzimas estão envolvidas na hidrólise do ATP extracelular, por exemplo, a família das ectonucleosídeo trifosfato-difosfoidrolases (E-NTPDase) (Song *et al.*, 2016). As ações sinalizadoras dos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina extracelulares ocorrem através de suas ligações a receptores específicos, os quais se dividem em receptores P1 – que têm a adenosina como principal ligante – e receptores

P2 – que têm ATP e ADP como principais ligantes. Os receptores P2 foram posteriormente subdivididos em ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P2Y) (White; Burnstock, 2006).

No que se refere ao processo carcinogênico, o sistema purinérgico desempenha importante papel, uma vez que os nucleotídeos e nucleosídeo de adenina atuam nesse contexto como moléculas sinalizadoras relacionadas à tromborregulação e à modulação de respostas imunes em pacientes com neoplasias (Burnstock; Knight, 2017). O ATP é um mensageiro extracelular ubíquo, estando presente em elevadas concentrações no microambiente tumoral, promovendo a sobrevivência celular via regulação da concentração de cálcio (Ca^{2+}) citosólico e favorecendo a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2, em detrimento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, em células de câncer de pulmão (Pasternak, 2002; Song *et al.*, 2016).

Song e colaboradores (2016) demonstraram uma distribuição de receptores P2X (P2X1-7) e P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11) diferente entre células de câncer de pulmão e células normais. Nesse estudo, o receptor purinérgico pró-apoptótico P2X7 foi quase indetectável nas células neoplásicas de pulmão e, assim, apesar dos altos níveis de ATP no microambiente tumoral, que induziriam a apoptose em células normais, a baixa expressão do receptor P2X7 e a relação Bcl-2/Bax elevada podem favorecer a sobrevivência das células tumorais, demonstrando que os níveis elevados de ATP extracelulares podem ser um importante fator para a progressão do câncer de pulmão (Song *et al.*, 2016).

Além disso, Takai *et al.* (2014) sugerem que a sinalização autócrina, através da liberação de ATP e da ativação do receptor P2X7, está envolvida na migração metastática de células de câncer de pulmão humano. Segundo os autores, o fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF-β1), conhecido por controlar diversos processos – proliferação, diferenciação, apoptose e migração celular – estimulou a liberação de ATP em células da linhagem H292 de câncer de pulmão humano. Contudo, ele não foi observado em células pulmonares da linhagem BEAS-2B, que não são cancerígenas. Além disso, o tratamento de células H292 com um antagonista específico do receptor P2X7 resultou na supressão da migração das células de câncer de pulmão induzida por TGF-β1.

Dando sequência, o mesmo estudo demonstrou que células da linhagem PC-9 de câncer de pulmão humano, em condições convencionais de cultura celular, liberaram grandes quantidades de ATP e apresentaram uma ativação

constitutiva do receptor P2X7. A linhagem celular PC-9 também exibiu elevada atividade motora, que foi inibida pelo tratamento com enzimas ecto-nucleotidases e antagonistas do receptor P2X7, enquanto que, na presença de agonista do receptor P2X7, foi observado um aumento na migração metastática dessa linhagem celular tumoral (Takai *et al.*, 2014).

Apesar de todas essas evidências, o papel do receptor P2X7 na progressão tumoral é muito complexo, e, nesse sentido, os estudos mostraram efeitos contraditórios em relação à ativação desse receptor em doenças neoplásicas (Burnstock; Knight, 2018). Isso fica evidente em estudo recente que constatou um aumento na sobrevida de pacientes com CPNPC que apresentavam elevada expressão do receptor P2X7, embora baixas expressões de P2X7 tenham resultado em aumento da expressão de mRNA (miR-21) em CPNPC, fato que favoreceria a progressão do tumor (Boldrini *et al.*, 2015). Esses resultados estão de acordo com o estudo de Souza e colaboradores (2012), que demonstrou que a expressão defeituosa de receptores P2X7, seguida da ativação de miR-21 por uma mutação do gene *KRAS*, provocou uma redução da morte de células tumorais resultando em mau prognóstico.

Além disso, estudos com linhagens celulares de carcinoma pulmonar A549, que expressam receptores P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2X4, mostram que a ocupação desses receptores pelo ATP promove um aumento dos níveis de Ca^{2+} e AMPc intracelulares, estimulando a proliferação dessas células (Clunes; Kemp, 1996; Remsbury; Rakhit; Wilson, 1996; White; Burnstock, 2006).

No que diz respeito à atividade das enzimas do sistema purinérgico em pacientes com câncer de pulmão, parece haver envolvimento destas em distúrbios da coagulação. Nesse contexto, De Cicco (2004) demonstrou que anormalidades nas atividades da coagulação sanguínea ocorrem em mais de 50% dos pacientes com doenças malignas, índice que aumenta para 90% na presença de metástases. Em consonância com esse achado, outros estudos, como o desenvolvido por Zanini e colaboradores (2012), mostraram que a atividade da E-NTPDase em plaquetas, para a hidrólise do ADP, apresentou-se diminuída no grupo de pacientes com CPNPC. Tal fato favorece o acúmulo desse nucleotídeo no meio extracelular e aumenta significativamente a agregação plaquetária nos pacientes com câncer de pulmão.

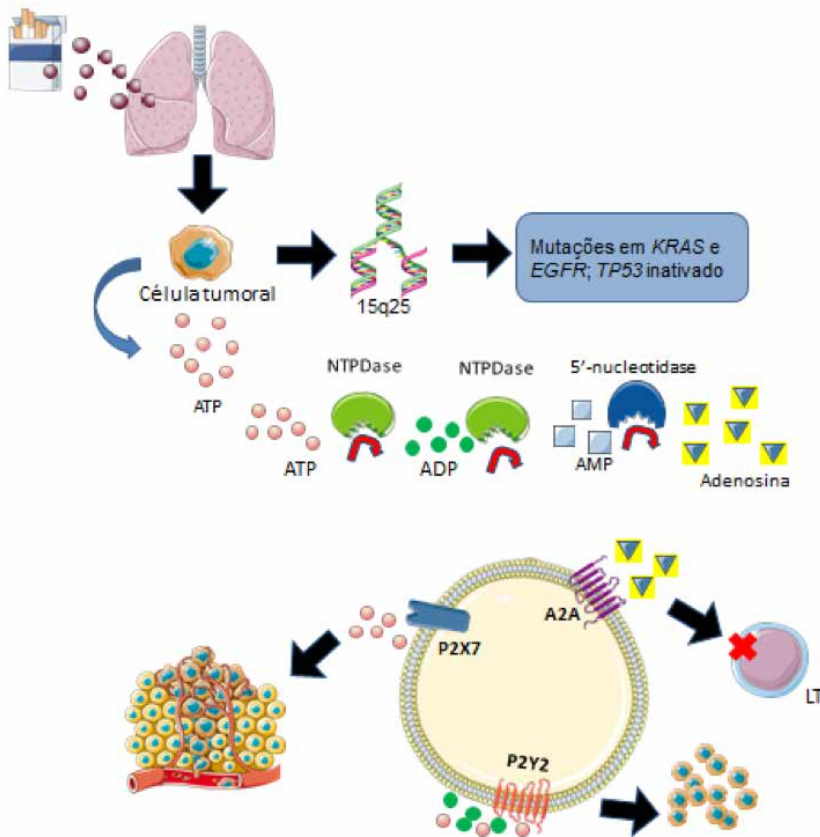
Além do envolvimento do ADP nos processos anômalos de coagulação sanguínea em pacientes com câncer de pulmão, a literatura destaca que os nucleotídeos

de adenina também são importantes na rota do crescimento tumoral. Munson e colaboradores (1995) sugerem que plaquetas podem secretar fatores de crescimento que estimulam a proliferação das células tumorais, além de protegerem as células malignas do contra-ataque das células do sistema imune. Dessa maneira, isso favorece o extravasamento de células tumorais para outros tecidos e consequentemente a formação de metástases (Stegner; Dütting; Nieswandt, 2014). Assim, os níveis elevados de ADP também poderiam favorecer progressão tumoral.

A ecto-5'-nucleotidase (CD73) é a enzima que converte AMP em adenosina e fosfato inorgânico. A adenosina extracelular liga-se aos receptores purinérgicos P1 (A1, A2A, A2B e A3), sendo o receptor de adenosina A2A predominantemente expresso na maioria das células imunes e em células de câncer de pulmão. A adenosina extracelular gerada por essa via inibe as funções antitumorais das células T, promovendo apoptose dessas células e possibilitando a evasão tumoral à resposta imune, além de estar relacionada aos eventos de proliferação emigração de células tumorais, neovascularização do tumor, desenvolvimento de metástases e resistência das células tumorais à quimioterapia antineoplásica (Inoue *et al.*, 2017).

Nesse mesmo sentido, o estudo desenvolvido por Zanini *et al.* (2012) demonstrou que a atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com CPNPC está aumentada, o que promoveria um incremento nos níveis de adenosina extracelulares, facilitando a progressão tumoral. Esse resultado corrobora, então, o observado por Inoue e colaboradores (2017), que verificou que a alta expressão da CD73 em pacientes com CPNPC é um indicador de mau prognóstico para essa patologia. Aliada a isso, a diminuição na atividade da enzima adenosina deaminase (ADA) observada no estudo de Zanini *et al.* (2012) colabora para o incremento dos níveis séricos de adenosina que, de acordo com o proposto por Spychala e Kitajewski (2004), poderia promover inclusive a resistência do tumor ao tratamento com drogas antineoplásicas.

A análise da Figura 1 facilita a compreensão do processo de carcinogênese pulmonar e das ações dos componentes do sistema purinérgico no desenvolvimento e progressão do câncer de pulmão.

Figura 1: Vias purinérgicas envolvidas na fisiopatogênese do câncer de pulmão

Fonte: autores (2019).

* Genotóxicos externos, a exemplo daqueles presentes no tabaco, atingem as células do epitélio pulmonar e árvore traqueobrônquica, promovendo lesão celular que pode desencadear mutações gênicas e liberação de ATP intracelular. O ATP liberado pelas células lesadas pode seguir dois caminhos: ligar-se diretamente em receptores purinérgicos (P2X7 e P2Y2) ou sofrer desfosforilação através da atuação das ectonucleotidases. A CD39 hidrolisa ATP e ADP em AMP, e a 5'-nucleotidase, por sua vez, hidrolisa o AMP em adenosina. Por fim, a ativação dos receptores purinérgicos pode desencadear diferentes respostas em relação ao tumor.

A ativação de receptores P2X7 pelo ATP favorece os processos metastáticos, já a ativação de P2Y2 tanto por ATP quanto por ADP promove a proliferação celular. Ativação de receptores A2A pela adenosina causa apoptose de linfócitos T e consequente evasão tumoral.

Modulação do sistema purinérgico como possibilidade terapêutica no câncer de pulmão

A quimioterapia antineoplásica sistêmica é, ainda hoje, a principal conduta terapêutica para o tratamento do câncer de pulmão. Todavia, o desenvolvimento de resistência tumoral às drogas antineoplásicas tem sido cada vez mais relatado, sendo um dos principais motivos de falha no tratamento. Destarte, faz-se necessária a introdução de novas possibilidades terapêuticas para as doenças neoplásicas, sendo que a modulação dos componentes do sistema purinérgico apresenta potencial promissor nesse sentido, visto que está intimamente relacionada com os processos de desenvolvimento, progressão e manutenção do microambiente tumoral (Swennen *et al.*, 2010).

A sinalização purinérgica tem sido implicada em muitos processos biológicos, indicando que o ATP e outros nucleotídeos extracelulares podem ter potencial terapêutico no tratamento do câncer por sinalização através de receptores P2. Estudos recentes, in vivo, sugerem que o uso do ATP pode diminuir as taxas de crescimento tumoral, agindo em subtipos de receptores P2, fornecendo, assim, novas ferramentas terapêuticas no tratamento de câncer (White; Burnstock, 2006).

Os antagonistas do receptor P2X7 são um promissor alvo terapêutico para o tratamento do câncer. Esse receptor está relacionado com a regulação dos processos inflamatórios e o poder de invasão das células tumorais e, portanto, antagonistas do receptor P2X7 são potenciais agentes antimetastáticos (Burnstock; Knight, 2017). Além disso, estudos mostram que o crescimento de tumores experimentais é fortemente inibido pelo antagonismo de receptores P2X7 em células tumorais e imunes, sendo que a expressão de um receptor P2X7 não funcional (nfP2X7), em células cancerígenas, tem sido proposta como um novo alvo terapêutico para o câncer em humanos (Burnstock; Knight, 2017). Da mesma forma, Takai e colaboradores (2014) mostraram que o tratamento de células

PC-9 de câncer de pulmão humano com antagonistas do receptor P2X7, por 48 horas, resultou na supressão da proliferação dessas células tumorais.

Com base nos resultados da pesquisa de Schneider e colaboradores (2015), os nucleotídeos liberados durante a realização de radioterapia e quimioterapia são pró-metastáticos e a inibição dos seus efeitos, via sinalização purinérgica, pode tornar-se um alvo terapêutico no câncer de pulmão. Além disso, Swennen *et al.* (2010) examinaram o potencial quimiossensibilizador do ATP para cisplatina. Nesse estudo, os pesquisadores verificaram que linhagens celulares humanas de carcinoma pulmonar de grandes células, previamente incubadas com ATP, aumentaram a captação de cisplatina, possibilitando uma indução mais eficiente da morte das células neoplásicas.

Ademais, Rao *et al.* (2014) demonstraram em modelo de CPNPC, em camundongos, uma aceleração da oncogênese com a inativação do gene Atg5. Posteriormente, descobriram que a ativação do oncogene KRAS em conjunto com a inativação do gene Atg5 favorece a expressão da CD39 (que apresenta ação imunossupressora). Segundo esse estudo, a inibição farmacológica da CD39 ou o bloqueio dos receptores de adenosina reduziriam a ativação de *KRAS* e a infiltração de células Treg em tumores com inativação do gene Atg5 e, dessa forma, o processo de oncogênese acelerada seria revertido.

Outro alvo terapêutico para o câncer de pulmão seria o bloqueio da interação da adenosina em receptores A2A, prevenindo a formação de um nicho imunossuprimido no microambiente tumoral (Inoue *et al.*, 2017). Nesse sentido, Wang e colaboradores (2018) mostraram que o bloqueio da CD73 pode aumentar a citotoxicidade antitumoral in vitro e in vivo, aumentando a atuação de células NK modificadas (CD56 + CAR-NK) contra tumores de pulmão, através do controle da supressão imune promovida pela adenosina. Embora sejam estudos pré-clínicos, essas observações abrem uma possibilidade investigativa para o desenvolvimento de imunoterapias que visem à neutralização da atividade da CD73, assim como a cascata de sinalização da adenosina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, é evidente que o sistema purinérgico desempenha papel fundamental na modulação do sistema imune e no controle da proliferação e apoptose celular, estando intimamente relacionado com o processo de desenvolvimento e progressão do câncer de pulmão. Considerando a forte correlação entre o processo de carcinogênese e a atividade dos componentes do sistema purinérgico, as investigações científicas que procuram elucidar esses mecanismos e sugerem a modulação desse sistema como campo terapêutico em potencial para tratamento das doenças neoplásicas, especialmente o câncer de pulmão, são de relevância indiscutível.

Dar sequência e incentivar as pesquisas desenvolvidas nesse campo de conhecimento é primordial para o entendimento dos processos tumorigênicos e para o desenvolvimento de novos fármacos que possam ser utilizados na terapia neoadjuvante ou adjuvante das neoplasias pulmonares, visando tratamentos mais eficientes e menos lesivos aos pacientes com câncer de pulmão.

REFERÊNCIAS

AKHTAR, N.; BANSAL, J. G. Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. Current Problems in Cancer, v. 41, n. 5, p. 328-339, set. 2017.

ALLEMANI, C. *et al.* Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). The Lancet, v. 385, n. 9972, p. 977-1010, mar. 2015.

ASKIN, F. B.; KAUFMAN, D. G. Histomorphology of human lung cancer. Cancer of the Respiratory, v. 8, p. 17-21, 1985.

BALANI, S.; NGUYEN, L. V.; EAVES, C. J. Modeling the process of human tumorigenesis. Nature Communications, v. 8, p. 15422-15432, maio 2017.

BILANO, V. *et al.* Global trends and projections for tobacco use, 1990-2025: an analysis of smoking indicators from the WHO Comprehensive Information Systems for Tobacco Control. The Lancet, v. 385, n. 9972, p. 966-976, jun. 2015.

BOLDRINI, L. *et al.* P2X7 mRNA expression in non-small cell lung cancer: Micro RNA regulation and prognostic value. OncologyLetters, v. 9, p. 449-453, 2015.

BRAWLEY, O. W. *et al.* The first surgeon general's report on smoking and health: The 50th anniversary. Ca: A Cancer Journal for Clinicians, v. 64, n. 1, p. 5-8, nov. 2013.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Ca: A Cancer Journal for Clinicians, v. 68, n. 6, p. 394-424, set. 2018.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. Purinergic Signalling, v. 14, n. 1, p. 1-18, nov. 2017.

CLUNES, M. T; KEMP, PJ. P2U purinoceptor modulation ofintracellular Ca2+ in a human lung adenocarcinoma cell line: down-regulation of Ca2+ influx by protein kinase C. CellCalcium, v. 20, p. 339-346, 1996.

DE CICCO, M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. Critical Reviews in Oncology/Hematology, v. 50, p. 187-96, 2004.

DIDKOWSKA, J. *et al.* Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. Annals of Translational Medicine, v. 4, n. 8, p. 1-11, abr. 2016.

DOLL, R.; PETO, R. Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationships among regular smokers and lifelong non-smokers. Journal of Epidemiology and Community Health, v. 32, p. 303-313, 1978.

DUNNILL, M. S. Pulmonary Pathology. New York: Churchill Livingstone, 1982.

EVANS, M. Lung cancer: needs assessment, treatment and therapies Lung. British Journal of Nursing, v. 22, p. 15-22, maio 2013.

GÖTTE, M; KOVALSZKY, I. Extracellular matrix functions in lung cancer. Matrix Biology, v. 73, p. 105-121, nov. 2018.

GOVINDAN, R. *et al.* Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never-Smokers. Cell, v. 150, n. 6, p. 1121-1134, set. 2012.

GRIDELLI, C. *et al.* Non-small-cell lung cancer. Nature Reviews Disease Primers, v. 1, p. 1-16, maio 2015.

HERBST, R. S.; HEYMACH, J. V.; LIPPMAN, S. M. Molecular origins of lung cancer. The New England Journal of Medicine, v. 13, n. 359, p. 1367-1380, set. 2008.

INOUE, Y. *et al.* Prognostic impact of CD73 and A2A adenosine receptor expression in non-small-cell lung cancer. Oncotarget, v. 8, n. 5, p. 8738-8751, jan. 2017.

MACLEOD, U. *et al.* Risk factors for delayed presentation and referral of symptomatic cancer: evidence for common cancers. British Journal of Cancer, v. 101, n. S2, p. S92, 2009.

MALHOTRA, J. *et al.* Risk factors for lung cancer worldwide. European Respiratory Journal, v. 48, n. 3, p. 889-902, maio 2016.

MUNSON, L.; UPADHYAYA, N. B.; METER, S. V. Platelet-derived growth factor promotes endometrial epithelial cell proliferation. American Journal of Obstetrics and Gynecology, v. 173, p. 1820-1825, 1995.

PASTERNAK, J. J. Genética molecular humana: mecanismos das doenças hereditárias. Ontario, Canadá: Manole, 2002.

RAO, S. *et al.* Autophagy in non-small cell lung carcinogenesis. Autophagy, v.10, n. 3, p. 529-531, jan. 2014.

REMSBURY, A.; RAKHIT, S; WILSON, S. M. P2U receptor agonistsdo not inhibit forskolin-evoked cAMP accumulation in A549 lungadenocarcinoma cells. The Journal of Physiology, 1996.

STEGNER, D.; DÜTTING, S.; NIESWANDT, B. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. Thrombosis Research, v.133, p. 149-157, 2014.

SCHMID, S. *et al.* Altered purinergic signaling in the tumor associated immunologic microenvironment in metastasized non-small-cell lung cancer. Lung Cancer, v. 90, n. 3, p. 516-521, dez. 2015.

SCHNEIDER, G. *et al.* Extracellular nucleotides as novel, underappreciated pro-metastatic factors that stimulate purinergic signaling in human lung cancer cells. Molecular Cancer, v. 14, n. 1, p. 1-15, nov. 2015.

SINGHAVI, H. *et al.* Tobacco carcinogen research to aid understanding of cancer risk and influence policy. Laryngoscope Investigative Otolaryngology, v. 3, n. 5, p. 372-376, out. 2018.

SPYCHALA, J.; KITAJEWSKI, J. WnT and b-catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. Experimental Cell Research, v. 296, p. 99-108, 2004.

SONG, S. *et al.* ATP promotes cell survival via regulation of cytosolic [Ca2+] and Bcl-2/Bax ratio in lung cancer cells. American Journal of Physiology-cell Physiology, v. 310, n. 2, p. 99-114, jan. 2016.

SOUZA; C. O. *et al.* Extracellular ATP induces cell death in human intestinal epithelial cells. Biochimica et Biophysica Acta, v. 12, p. 1867-1878, 2012.

SPENCER, H. Pathology of the Lung. Oxford: Pergamon Press, 1977.

SWENNEN, E. L. *et al.* ATP sensitizes H460 lung carcinoma cells to cisplatin-induced apoptosis. Chemico-biological Interactions, v. 184, n. 3, p. 338-345, mar. 2010.

TAKAI, E. *et al.* Autocrine signaling via release of ATP and activation of P2X7 receptor influences motile activity of human lung cancer cells. Purinergic Signalling, v. 10, n. 3, p. 487-497, mar. 2014.

TOD, A. M.; CRAVEN, Jacqueline; ALLMARK, Peter. Diagnostic delay in lung cancer: a qualitative study. Journal of advanced nursing, v. 61, n. 3, p. 336-343, 2008.

TORRE, L. A. *et al.* Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends-An Update. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, v. 25, n. 1, p. 16-27, dez. 2015.

TORRE, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. Ca: A Cancer Journal for Clinicians, v. 65, n. 2, p. 87-108, fev. 2015b.

WANG, J. *et al.* Purinergic targeting enhances immunotherapy of CD73+ solid tumors with piggyBac-engineered chimeric antigen receptor natural killer cells. Journal for Immunotherapy of Cancer, v. 6, n. 1, p. 2-14, dez. 2018.

WEST, L. *et al.* A Novel Classification of Lung Cancer into Molecular Subtypes. Plos One, v. 7, n. 2, p. 1-5, fev. 2012.

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. Trends in Pharmacological Sciences, v. 27, n. 4, p. 211-217, abr. 2006.

YOULDEN, D. R. *et al.* The International Epidemiology of Lung Cancer: Geographical Distribution and Secular Trends. Journal of Thoracic Oncology, v. 3, n. 8, p. 819-831, ago. 2008.

ZANINI, D. *et al.* Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 66, n. 1, p. 40-45, fev. 2012.

REGULAÇÃO PURINÉRGICA DO SISTEMA HEMATOPOÉTICO

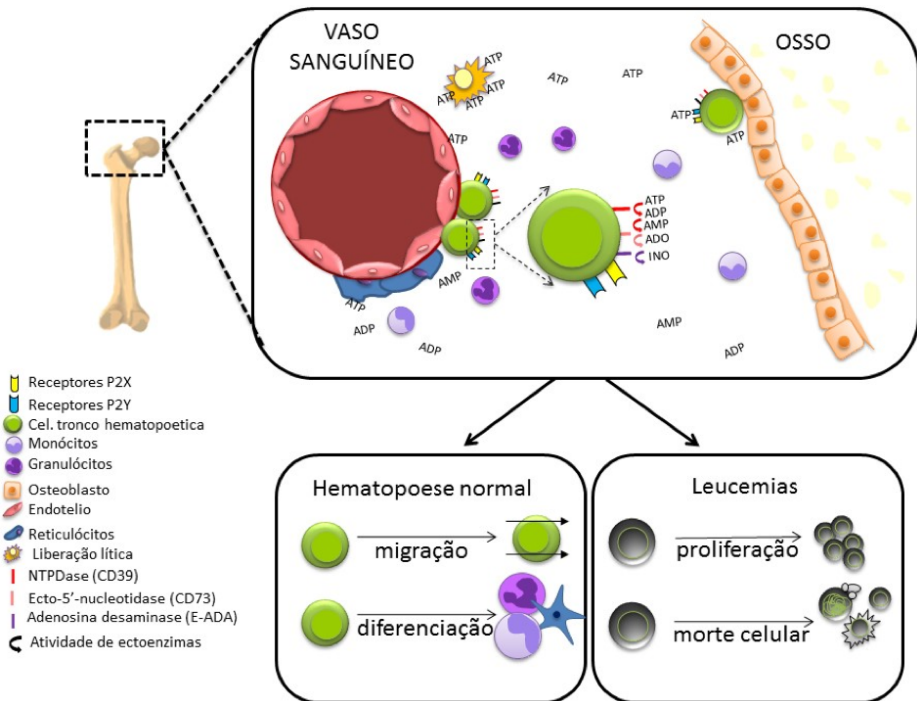
Kamylla Fernanda Souza de Souza
Luciana Rocha Costa
Edgar J. Paredes-Gamero
Jeandre Augusto dos Santos Jaques

INTRODUÇÃO

A regulação da quiescência, autorenovação, proliferação, diferenciação, e morte da célula-tronco hematopoética (CTH) é o âmago deste sistema. Este processo, conhecido como hematopoese, é regulado por diversos sinalizadores humorais, principalmente por moléculas conhecidas como citocinas. Entretanto, ademais das citocinas, outros sinalizadores, como o ATP, também são relevantes neste processo. O ATP é um sinalizador importante em diversos sistemas, mas intriga a forma de regulação do sistema hematopoético, porque os receptores de ATP – P2 são expressos desde as células mais primitivas hematopoéticas, até os diferentes tipos de células maduras deste sistema. Além dos receptores P2, enzimas que degradam o ATP em metabólitos como ADP e adenosina fazem parte desta regulação formando um complexo esquema de regulação purinérgica (Figura 1).

Embora o papel mais marcante e investigado dos receptores P2 seja em processos de regulação do sistema imune, recentes trabalhos vêm mostrando o papel fundamental da regulação purinérgica no desenvolvimento hematopoético e as consequências biológicas das alterações na expressão e função dos receptores e enzimas que regulam o sistema purinérgico. Neste capítulo, descreveremos as

funções conhecidas dos receptores P2 e das enzimas CD39 e CD73 no desenvolvimento normal da hematopoese, e as alterações observadas em cânceres hematológicos.

Figura 1: Componentes do sistema purinérgico no microambiente hematopoético

Fonte: autores (2019).

* Diferentes sinalizadores autócrinos e parácrinos modulam a regulação das CTH. Além dos mecanismos líticos de liberação do ATP, o endotélio dos vasos sanguíneos e os osteoblastos secretam ATP, entre outros sinalizadores. O ATP regula a CTH normal e leucêmica por ativação de receptores P2 que podem ser do tipo ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P2Y). Entre as principais funções da ativação de receptores pode-se citar a diferenciação e a migração de CTH, bem como a indução de proliferação ou morte celular de células leucêmicas. O ATP pode ser

degradado por ectonuclotidases, como a CD39 e a CD73, gerando ADP, AMP, ADO e INO, que ativam outros receptores, como os receptores P1. Todos os processos que envolvem desde a liberação do ATP, sua degradação e a ativação de diferentes receptores P2 e P1 mostram a presença de uma complexa regulação purinérgica da CTH normal e leucêmica.

Função dos receptores P2 na hematopoese

Entre as primeiras descrições de participação dos receptores purinérgicos em células do sistema hematopoético, pode-se destacar o trabalho de Cockcroft & Gomperts (1980) em mastócitos. Neste estudo, observou-se que o ATP produz a liberação de histamina e secreção de metabólitos (Cockcroft e Gomperts, 1980). Um receptor em particular foi descrito em macrófagos, na linhagem murina J774, chamado inicialmente de receptor P2Z(Steinberg e Silverstein, 1987) e atual receptor P2X7 (Surprenant *et al.*, 1996). A ativação do receptor P2X7 leva à abertura de um canal iônico e à formação de um poro capaz de permitir a passagem de moléculas de até 900 Da (Steinberg e Silverstein, 1987; Surprenant *et al.*, 1996). Posteriormente, o receptor P2X7 foi descrito em monócitos e macrófagos de diversas origens (Naumov *et al.*, 1992; Hickman *et al.*, 1994; Nuttle e Dubyak, 1994; Paredes-Gamero *et al.*, 2004). Porém, não é o único receptor expresso em macrófagos; pelo contrário, é comum que células primárias expressem mais de um receptor P2.

Além dos monócitos/macrófagos, outras células mieloides expressam os receptores P2 como eosinófilos (Idzko *et al.*, 2001; Mohanty *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2016), granulócitos (Cockcroft e Stutchfield, 1989; Balazovich e Boxer, 1990; Suh *et al.*, 2001; Paredes-Gamero *et al.*, 2007), eritrócitos e eritroblastos (Hoffman *et al.*, 2004; Sluyter *et al.*, 2004; Paredes-Gamero *et al.*, 2006), plaquetas (Hall e Hourani, 1994; Turner *et al.*, 2001), além dos diferentes tipos de linfócitos. Embora este tema tenha sido abordado em revisões anteriores (Di Virgilio *et al.*, 2001; Burnstock, 2015), uma completa caracterização molecular e farmacológica dos receptores P2 nos diferentes tipos de células hematopoéticas ainda é necessária.

Apesar de ser conhecido que as células hematopoéticas expressam receptores P2, seu envolvimento com a hematopoese ainda não foi totalmente elucidado.

Até o momento, a presença destes receptores, mesmo nas células mais indiferenciadas, e a variação da expressão com a diferenciação, indica uma provável participação na hematopoese. As células endoteliais e os osteoblastos, que podem liberar ATP (Orriss *et al.*, 2009; Alvarenga *et al.*, 2010; Lim To *et al.*, 2015), são células presentes nos diferentes nichos medulares nos quais a CTH habita, podendo regular a atividade da CTH por liberação do ATP e outras moléculas sinalizadoras (Nogueira-Pedro *et al.*, 2014).

Mostrou-se que o ATP atuou sinergicamente com citocinas, aumentando o número de células hematopoéticas primitivas humanas $CD34^+$ em culturas de metilcelulose (Lemoli *et al.*, 2004). Essas células primitivas humanas $CD34^+$ expressaram vários receptores P2: P2Y1, P2Y2, P2Y12, P2X1-7 (Lemoli 2004, Wang *et al.* 2004). Ademais, o estímulo com UTP aumenta a migração das CTH, inibe a *down-regulation* do receptor de quimiocinas CXC do tipo 4 (CXCR4) e aumenta a adesão à fibronectina de células $CD34^+$ humanas *in vitro* (Rossi *et al.*, 2007). Em experimentos *in vivo*, utilizando animais imunodeficientes, mostrou--se que o estímulo das células $CD34^+$ humanas com UTP aumentou a eficiência do *homing* (ROSSI *et al.*, 2007). A modulação direta da diferenciação de células primitivas hematopoéticas pelo ATP também foi reportada. O ATP e seus análogos, diferente das citocinas, produziram grandes aumentos da concentração de cálcio citoplasmático ($[Ca^{2+}]_{cit}$) levando à diferenciação mieloide das células primitivas hematopoéticas em culturas de medula óssea (Paredes-Gamero *et al.*, 2008). Posteriormente, um estudo mostrou que a diferenciação promovida pelo ATP afetou principalmente as populações de CTH e progenitor mieloide comum de granulócitos/monócitos (Barbosa *et al.*, 2011). Também foi descrito que o ATP reduziu o número de células primitivas hematopoéticas aumentando a população mieloide $Gr\text{-}1^+Mac\text{-}1^+$, diminuiu a expressão do receptor Notch-1 e reduziu a quiescência e a capacidade de enxerto da CTH (Barbosa *et al.*, 2011). Outro aspecto interessante que se observou foi que o aumento da $[Ca^{2+}]_{cit}$ pelo ATP reduziu-se na presença de citocinas, como interleucina-3 e *stem cell factor* nas CTH, e que estas citocinas inibiram a diferenciação das CTH induzida pelo ATP (Barbosa *et al.*, 2011).

Um receptor P2 descrito na modulação hematopoética é o receptor P2Y14. Em condições normais, a ausência do receptor em animais nocautes P2Y14-/- não afetou a biologia das células do sistema hematopoético. Porém, em situações de estresse – radiação, envelhecimento, quimioterapia e transplante –, o padrão

de senescência e morte celular das CTH foram modificados, observando-se aumento de espécies reativas de oxigênio, expressão elevada de p16^{INK4a}, além de hipofosforilação da Proteína de Retinoblastoma (Cho *et al.*, 2014).

A participação do receptor P2X7 na hematopoese também foi destacada. A quantificação do receptor P2X7 mostrou baixa expressão em CTHs murinas; entretanto, a superexpressão deste receptor nessa população, por transfecção viral, reduziu o potencial de enxerto, em ensaio *in vivo*, elevou a diminuição da capacidade de formação de colônias, afetando, principalmente, as colônias mais primitivas em ensaios *in vitro*, principalmente da unidade formadora de colônias de granulócitos-eritrócitos-macrófagos-megacariócitos (Feng *et al.*, 2016). A mobilização das CTH é importante em processos de resposta imune por dano às células dos tecidos ou em resposta a fármacos mobilizadores de CTH, como o fator estimulador de colônias de granulócitos, uma citocina fisiológica. A mobilização das CTH foi afetada pela liberação de ATP, via panexina-1, e a formação do seu metabólito adenosina, sendo que animais nocautes P2X7-/- apresentaram baixa mobilização (Adamiak *et al.*, 2018).

Receptores purinérgicos e leucemia

O papel dos receptores purinérgicos na leucemia vem sendo estudado com o objetivo de detectar possíveis alterações que possam ser usadas em diagnósticos, prognósticos e tratamentos. Esses receptores são expressos em linhagens estabelecidas e células primárias leucêmicas, sendo que são encontrados diferentes subtipos ativados por nucleotídeos, dificultando o estudo farmacológico dos mecanismos de ação e do efeito final.

Estudos iniciais mostraram a presença dos receptores P2 em linhagens leucêmicas, como a HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e CB1 (leucemia linfoblástica aguda) (Biffen e Alexander, 1994; Montero *et al.*, 1995). A variação da expressão e da resposta funcional de receptores P2 durante a diferenciação mieloide, em células leucêmicas, foi relatada, em especial, usando a linhagem HL-60 (Montero *et al.*, 1995; Adrian *et al.*, 2000; Communi *et al.*, 2000).

A expressão e função do receptor P2X7 são mais avaliadas por suas características únicas e as ferramentas farmacológicas que ele possui. A ativação do receptor P2X7 foi inicialmente correlacionada com a morte celular por sua capacidade de

formar poros na membrana (Steinberg; Silverstein, 1987; Surprenant *et al.*, 1996; Zoetewij *et al.*, 1996; schulze-Lohoff *et al.*, 1998), porém também foi relacionado com a proliferação celular (Yu *et al.*, 2010). Em leucemias, a participação do receptor P2X7 na proliferação e morte celular por apoptose, necrose ou piroptose foi descrita. Em estudos iniciais, constatou-se que o receptor P2X7 foi altamente expresso nas linhagens U-937 (linfoma histocítico) e KG-1 (leucemia mieloide aguda). Nas linhagens HL-60 e J6-1 (leucemia mieloide), o receptor P2X7 teve expressão moderada, enquanto que, nas linhagens K562 (leucemia mieloide crônica) e linhagens de linfoma de Burkitt (Raji e Ramos), a expressão não foi detectada (Zhang *et al.*, 2004). Outro estudo também relatou a expressão funcional do receptor P2X7 em células KG-1 (Gadeock *et al.*, 2012). Na linhagem celular de eritroleucemia murina, o receptor P2X7 foi responsável por induzir morte celular e liberação de micropartículas (Constantinescu *et al.*, 2010).

Em leucemias mieloides, alguns estudos identificaram alterações na expressão gênica de receptores P2. Em células extraídas de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA), os receptores P2X1, P2X4, P2X5 e P2X7 são mais expressos em relação às células normais, enquanto que P2X2, P2X3 e P2X6 não são detectados (Zhang *et al.*, 2004). Dentre os receptores regulados positivamente em casos de LMA, destaca-se o receptor P2X7. A alta expressão do receptor P2X7 foi relacionada com recidiva em leucemias agudas em crianças, enquanto que a diminuição da expressão do receptor foi observada após o tratamento quimioterápico (Chong *et al.*, 2010). Os efeitos antiproliferativos observados em células blásticas e em células-tronco leucêmicas de pacientes LMA, após estímulo com ATP, sem que o mesmo efeito seja observado em células normais, geram expectativas para terapias inovadoras (Salvestrini *et al.*, 2012; Salvestrini *et al.*, 2017).

A leucemia linfocítica crônica de células B (B-LLC) é a leucemia com maior frequência entre os adultos no mundo ocidental. Causada pela expansão clonal de linfócitos B, caracteriza-se pela perda da capacidade apoptótica dos linfócitos leucêmicos CD5+ que se acumulam na circulação. Os sinais clínicos divergem, pois a doença possui duas variantes – a indolente e a progressiva – e dois subtipos, sendo um com mutações somáticas na região variável de cadeia pesada da imunoglobulina e outro não mutado (Hamblin *et al.*, 1999; Di Virgilio; Wiley, 2002). A expressão do receptor P2X7 foi correlacionada com a gravidade da doença em pacientes com B-LLC (Adinolfi *et al.*, 2002). Em casos de pacientes que apresentavam a forma mais agressiva da doença, a expressão do receptor P2X7

foi maior, até mesmo em condições desfavoráveis, como baixa disponibilidade de fatores de crescimento (Adinolfi *et al.*, 2002).

Dentre os numerosos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do receptor P2X7, o 1513A->C é muito estudado em relação ao câncer e se caracteriza pela substituição de adenina por citosina na posição 1513, que, em vez de gerar o aminoácido ácido glutâmico na cauda C-terminal do receptor P2X7, gera uma alanina. Alguns estudos investigaram a relação do polimorfismo 1513 A->C com a B-LLC. Inicialmente, foi proposto que a perda de função do receptor causada por essa mutação favoreceria efeitos antiapoptóticos e, consequentemente, aumentaria a patogênese (Wiley *et al.*, 2002). Outro estudo mostrou que este polimorfismo estava correlacionado com a melhora nos resultados clínicos na B-LLC, aumentando a sobrevida dos pacientes (Thunberg *et al.*, 2002). Nos anos seguintes, os estudos correlacionaram pacientes saudáveis e pacientes com B-LLC familiar e/ou esporádica, e a relação do polimorfismo 1513 A->C com essa doença foi invalidada em todos os aspectos estudados anteriormente: patogênese, progressão, diagnóstico e sobrevida (Starczynski *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Nückel *et al.*, 2004; Sellick *et al.*, 2004).

NTPDase (CD39) e ecto-5'-nucleotidase (CD73) na regulação do sistema hematopoético normal e leucêmico

O papel de ectonucleotidases – NTPDase (CD39) e ecto-5'-nucleotidase (CD73), por exemplo – na imunomodulação e nas interações célula-célula vem sendo estudado em diferentes condições clínicas relacionadas às alterações no sistema imunológico.

A atividade ectonucleotidase pode também estar associada com a regulação do estado indiferenciado das CTH. Além do efeito de diferenciação do ATP em CTH murinas, também foi observado que as CTH tinham uma maior expressão de CD39 e CD73 em relação a células hematopoéticas mais maduras, e a população de células primitivas c-Kit^{+} exibiu uma maior atividade ectonucleotidase do que as células totais da medula óssea ou células CD45-Ter119-(Barbosa *et al.*, 2011). Um estudo mostrou que uma população de linfócitos T regulatórios são CD150^{high} e estão localizados no nicho das CTH da medula óssea (Hirata *et al.*, 2018). A redução de linfócitos regulatórios da medula óssea, obtida por deleção

condicionada de CXCR4 nesta população, aumentou o número de CTH na medula óssea (Hirata *et al.*, 2018). Animais com expressão condicionada de CD39 em linfócitos T regulatórios CD150^{high} mostraram que a adenosina extracelular, gerada pela atividade da enzima CD39, protege as CTH do estresse oxidativo e mantém as CTH quiescentes (Hirata *et al.*, 2018). O mesmo grupo mostrou também que esta população de linfócitos T regulatórios convencionais e CD150^{high} modulam a CTH via a atividade da enzima CD73 (Hirata *et al.*, 2018). A deleção da enzima CD73 aumentou o número, a frequência de ciclo celular e as espécies reativas de oxigênio das CTH (Hirata *et al.*, 2018). O uso de antioxidantes inibiu o aumento das CTH em animais nocautes para CD73, mantendo as células quiescentes (Hirata *et al.*, 2018). Assim, a atividade das enzimas CD39 e CD73 impediu a diferenciação das células CTH pelo ATP, devido à produção de adenosina que manteria as células quiescentes.

Outras atividades relatadas das enzimas CD39 e CD73 são em doenças leucêmicas, por exemplo, na leucemia linfoide crônica (LLC) e na leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Schetinger *et al.*, 2007).

Linfócitos T reguladores de pacientes com LLC apresentaram marcadores, dentre eles, a CD39, associados a um aumento na atividade supressora nestas células (Biancotto *et al.*, 2012). A expressão aumentada de CD39 foi identificada nos linfócitos T de sangue periférico de pacientes com LLC, sendo mais elevada nos estágios mais avançados da doença (Pulte *et al.*, 2007; Abousamra *et al.*, 2015).

A expressão aumentada de linfócitos T CD4+ CD39+ no sangue periférico de pacientes com LLC correlaciona-se também com casos em que há necessidade de intervenção terapêutica. No entanto, um aumento ainda maior de linfócitos CD4+ CD39+ foi observado na medula óssea desses pacientes, possivelmente devido à exposição dessas células ao ATP, colaborando para a formação de um ambiente imunosubversivo (Perry *et al.*, 2012).

A LLC raramente apresenta trombose como uma de suas complicações, o que pode ser explicado pela presença de CD39 na superfície das células tumorais, nas quais apresenta atividade enzimática alta, promovendo inibição da agregação e recrutamento plaquetário por meio da hidrólise de ADP em AMP (Pulte *et al.*, 2011).

A inibição de CD39 tem sido sugerida principalmente como alvo para uma nova terapia imune para LLC, visto que sua atividade enzimática inibe as respostas

de linfócitos T e células *natural killer* (NK) devido à hidrólise de ATP em ADP, e suprime o sistema imunológico (Mosaad Zaki *et al.*, 2018).

Há uma expressão aumentada de CD73 em casos de LLC em áreas correspondentes ao centro de proliferação e região perivascular ao tumor. Sua atividade enzimática, com consequente aumento da adenosina extracelular, propicia uma significativa regulação negativa de respostas quimiotáticas por quimiocinas CXC 12(CXCL12) via ativação de receptores A2A (SERRA *et al.*, 2011). Já a expressão de CD73 em linfócitos T de sangue periférico se encontra diminuída em pacientes com LLC (Pulte *et al.*, 2011). A expressão de CD73 em células de LLC está associada com a agressividade do tumor, evidenciando a importância de seu estudo também como potencial alvo terapêutico (Allard *et al.*, 2016).

Inibir a formação de adenosina e sua sinalização pode ser uma forma de combater as condições locais favoráveis ao tumor. Combinando essa nova terapia com fármacos que atingem diretamente o tumor ou restauram as funções imunes, é possível desenvolver novas estratégias de tratamento para doenças como a LLC (Serra *et al.*, 2016).

Com a realização do perfil transcriptômico em pacientes com LLC com trissomia do cromossomo 12 como a única anomalia citogenética, identificou-se um conjunto único de genes diferencialmente expressos, dos quais se destacaram os genes codificantes da CD73 (Abruzzo *et al.*, 2018).

A expressão de CD73 nas células da medula óssea não influencia o prognóstico de crianças com LLA (Wieten *et al.*, 2011). No entanto, a identificação de CD73 por citometria de fluxo pode ser utilizada como marcador de doença residual mínima em pacientes com LLA de células B. O marcador CD73 foi detectado nestes pacientes antes do tratamento, porém, somente após o início da quimioterapia, se observou uma expressão elevada (Wang *et al.*, 2016).

Uma busca por novos marcadores para detecção de doença residual mínima apresentou CD73 superexpressa em 54,5% de amostras de medula óssea em pacientes com LLA recentemente diagnosticada na infância (Coustan-Smith *et al.*, 2011). A expressão aumentada de CD73 foi detectada em 90,41% dos casos de LLA de células B, indicando que a adição deste marcador como indicador prognóstico pode contribuir na identificação de doença residual mínima (Jain *et al.*, 2018).

CD73 foi o marcador para identificação de doença residual mínima mais estável em estudo com pacientes pediátricos com LLA precursora B, apresentando

expressão estável ou elevada em 95% dos casos após 15 dias do início da terapia (Sedek *et al.*, 2018; Tembhare *et al.*, 2018).

Contudo, pacientes com LMA expressaram quantidades similares de CD73 quando comparados com indivíduos saudáveis, e suas células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea também expressaram marcadores de superfície celular e proteínas de adesão semelhantes ao controle (Huang *et al.*, 2015).

Estudos com clones de linfócitos T leucêmicos resistentes a apoptose (A4) sugerem que o CD73 faz parte de um programa antiapoptótico complexo não específico. Essas células apresentaram expressão de CD73 em sua superfície e atividade enzimática significativa, inibindo a sinalização TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) por meio de uma interação com o receptor de morte 5, colocalizado na membrana plasmática (Mikhailov *et al.*, 2008).

Como consequência da expressão de ecto-enzimas como CD39 e CD73, altos níveis de adenosina extracelular são detectados especialmente na LLC. A adenosina extracelular possui influência na progressão da doença por meio da ativação de receptores A2A, dificultando a ação de células do sistema imune e aumentando a sobrevida das células leucêmicas. A modulação da resposta imune, angiogênese e liberação de citocinas no microambiante tumoral é influenciada pela ampla distribuição desses receptores de adenosina nas células tumorais (Cai *et al.*, 2018).

Estudos clínicos multicêntricos em fase I já avaliam o uso de anticorpos anti-CD73 sozinhos ou em combinação em pacientes com tumores sólidos avançados. Sendo assim, a utilização clínica de terapia anti-CD73 representa um promissor instrumento que poderá ser integrado aos esquemas de quimio-radiação convencionais ou outras novas estratégias imunológicas (Antonioli *et al.*, 2016).

Adenosina desaminas

Desde a década de 1970, a atividade da adenosina desaminase (E-ADA) vem sendo investigada em pacientes com leucemia. A atividade da E-ADA encontra-se diminuída em linfócitos de crianças com LLA (Zimmer *et al.*, 1975) e em linfócitos B de pacientes com LLC (Tung *et al.*, 1976). No entanto, observou-se atividade enzimática aumentada em linfoblastos de células T de pacientes com LLA (Smyth *et al.*, 1978), em células leucêmicas de pacientes com LMA (Mejer;

Nygaard, 1979), e no plasma de pacientes com LLA não tratada e em estágio de remissão (Morisaki *et al.*, 1985).

No soro de pacientes com LLC foi estabelecida uma correlação entre a atividade aumentada da E-ADA e outros marcadores diagnósticos como beta-2--microglobulina, lactato desidrogenase, contagem de leucócitos e velocidade de hemossedimentação (Ghaderi *et al.*, 2016). Já na LLA, a atividade da E-ADA em casos novos e pacientes com recidiva é significantemente maior do que em pacientes em estágio de remissão da doença e controles saudáveis, indicando que esta enzima também pode ser usada como biomarcador no diagnóstico e acompanhamento do tratamento dessa doença (Ebrahimi-Rad *et al.*, 2018).

A inibição da E-ADA foi estudada primeiramente *in vivo*, apresentando importantes implicações na LLA e LLC, como promoção da lise dos linfoblastos e linfócitos T maduros (Mitchell *et al.*, 1985). Diferentes inibidores da E-ADA também foram testados em cultura de células de leucemia monocítica.

A 2'-desoxicoformicina (pentostatina), que consiste em um análogo de purina utilizado como fármaco no tratamento anticâncer, principalmente em casos de leucemia de células pilosas, foi o primeiro a receber aprovação da *Food and Drug Administration* (*FDA*) nos Estados Unidos (Kane *et al.*, 1992; Grever *et al.*, 2003). O mecanismo de ação proposto inicialmente consiste na potente inibição da adenosina desaminase, que provoca um acúmulo de metabólitos que inibem a nucleotídeo redutase e, consequentemente, bloqueiam a síntese de DNA nessas células (Dillman, 2004). Posteriormente, foi sugerido que o acúmulo de adenosina e desoxiadenosina levam à formação desoxiadenosina trifosfato (dATP) nos linfócitos do plasma sanguíneo, que provoca acúmulo de quebras na fita de DNA, resultando na ativação de p53, liberação de citocromo c pela mitocôndria e, consequentemente, apoptose (Johnston, 2011).

Apesar de o tratamento com pentostatina combinada a outros fármacos, como a ciclofosfamida, ser eficaz no tratamento de LLC, esses efeitos são atribuídos à sua capacidade de induzir a apoptose e não às alterações nos níveis extracelulares de adenosina (Sauter *et al.*, 2008). Além disso, essa terapia apresenta toxicidade tolerável em longo prazo e nenhum caso relacionado de complicação como LMA e síndrome mielodisplásica (Kay *et al.*, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de receptores de receptores P1 e P2, mesmo nas células mais indiferenciadas, e a variação da expressão com a diferenciação sugerem a participação na hematopoese em diversos aspectos, dependendo do subtipo de receptor ativado. Os principais trabalhos nesta área mostraram que os receptores P2 modulam a capacidade de formar colônias das células progenitoras hematopoéticas e a diferenciação, migração, homing e capacidade de enxerto da CTH. Esses estudos vêm mostrando a presença de um complexo sistema de regulação com a participação das ectonucleotidases (CD39 e CD73), que mostra a interação dos receptores P2 com os receptores P1.

Todos esses estudos revelam um promissor potencial modulatório a partir do estudo da regulação purinérgica no sistema hematopoético. Potencial que se evidencia ao analisar as alterações da regulação purinérgica em leucemias, em que diversas funções dos receptores P2 e das ectonucleotidases mostraram-se alterados. Espera-se que o aprofundamento da regulação purinérgica neste sistema proporcione importantes ferramentas para uso clínico num futuro próximo.

REFERÊNCIAS

ABOUSAMRA, N. K. *et al.* Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (E-NTPDase1/CD39) as a new prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma, v. 56, n. 1, p. 113-9, Jan 2015. ISSN 1029-2403 (Electronic) 1026-8022 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24684231.

ABRUZZO, L. V. *et al.* Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia expresses a unique set of activated and targetable pathways. Haematologica, v. 103, n. 12, p. 2069-2078, Jul. 5 2018. ISSN 1592-8721 (Electronic) 0390-6078 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29976738.

ADAMIAK, M. *et al.* Novel evidence that extracellular nucleotides and purinergic signaling induce innate immunity-mediated mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. Leukemia, v. 32, n. 9, p. 1920-1931, Sep 2018. ISSN 1476-5551 (Electronic)0887-6924 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29725032.

ADINOLFI, E. *et al.* P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. Blood, v. 99, n. 2, p. 706-708, 2002. ISSN 0006-4971.

ADRIAN, K. *et al.* Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X1-7 and metabotropic P2Y1-11) during myeloid differentiation of HL60 cells. Biochim Biophys Acta, v. 1492, n. 1, p. 127-38, Jun. 21 2000. ISSN 0006-3002 (Print).0006-3002 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11004484.

ALLARD, D. *et al.* CD73-adenosine: a next-generation target in immuno-oncology. Immunotherapy, v. 8, n. 2, p. 145-63, Feb. 2016. ISSN 1750-7448 (Electronic) 1750-743X (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26808918.

ALVARENGA, E. C. *et al.* Low-intensity pulsed ultrasound-dependent osteoblast proliferation occurs by via activation of the P2Y receptor: role of the P2Y1 receptor. Bone, v. 46, n. 2, p. 355-62, Feb 2010. ISSN 1873-2763 (Electronic) 1873-2763 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781676.

ANTONIOLI, L. *et al.* Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. Trends Cancer, v. 2, n. 2, p. 95-109, Feb 1 2016. ISSN 2405-8033 (Print) 2405-8025 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27014745.

BALAZOVICH, K. J.; BOXER, L. A. Extracellular adenosine nucleotides stimulate protein kinase C activity and human neutrophil activation. J Immunol, v. 144, n. 2, p. 631-7, Jan 15 1990. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2153172.

BARBOSA, C. M. *et al.* Differentiation of hematopoietic stem cell and myeloid populations by ATP is modulated by cytokines. Cell Death Dis, v. 2, p. e165, Jun 2 2011. ISSN 2041-4889 (Electronic).

Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633388.

BIANCOTTO, A. *et al.* Phenotypic complexity of T regulatory subsets in patients with B-chronic lymphocytic leukemia. Mod Pathol, v. 25, n. 2, p. 246-59, Feb 2012. ISSN 1530-0285 (Electronic) 0893-3952 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101351.

BIFFEN, M.; ALEXANDER, D. R. Mobilization of intracellular Ca2+ by adenine nucleotides in human T-leukaemia cells: evidence for ADP-specific and P2y-purinergic receptors. Biochemical Journal, v. 304, n. 3, p. 769-774, 1994. ISSN 0264-6021.

BURNSTOCK, G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling. Purinergic Signal, v. 11, n. 4, p. 411-34, Dec 2015. ISSN 1573-9546 (Electronic) 1573-9538 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26260710.

CAI, Y.; FENG, L.; WANG, X. Targeting the tumor promoting effects of adenosine in chronic lymphocytic leukemia. Crit Rev Oncol Hematol, v. 126, p. 24-31, Jun 2018. ISSN 1879-0461 (Electronic) 1040-8428 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29759563.

CHO, J. *et al.* Purinergic P2Y(1)(4) receptor modulates stress-induced hematopoietic stem/progenitor cell senescence. J Clin Invest, v. 124, n. 7, p. 3159-71, Jul 2014. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24937426.

CHONG, J. H. *et al.* Abnormal expression of P2X family receptors in Chinese pediatric acute leukemias. Biochemical and biophysical research communications, v. 391, n. 1, p. 498-504, 2010. ISSN 0006-291X.

COCKCROFT, S.; GOMPERTS, B. D. The ATP4- receptor of rat mast cells. Biochem J, v. 188, n. 3, p. 789-98, Jun 15 1980. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6162453.

COCKCROFT, S.; STUTCHFIELD, J. The receptors for ATP and fMetLeuPhe are independently coupled to phospholipases C and A2 via G-protein(s). Relationship between phospholipase C and A2 activation and exocytosis in HL60 cells and human neutrophils. Biochem J, v. 263, n. 3, p. 715-23, Nov 1 1989. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2512911.

COMMUNI, D. *et al.* Rapid up-regulation of P2Y messengers during granulocytic differentiation of HL-60 cells. FEBS letters, v. 475, n. 1, p. 39-42, 2000. ISSN 0014-5793.

CONSTANTINESCU, P. *et al.* P2X7 receptor activation induces cell death and microparticle release in murine erythroleukemia cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, v. 1798, n. 9, p. 1797-1804, 2010. ISSN 0005-2736.

COUSTAN-SMITH, E. *et al.* New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. Blood, v. 117, n. 23, p. 6267-76, Jun 9 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971

(Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21487112.

DI VIRGILIO, F. *et al.* Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. Blood, v. 97, n. 3, p. 587-600, Feb 1 2001. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157473.

DI VIRGILIO, F.; WILEY, J. S. The P2X7 receptor of CLL lymphocytes-a molecule with a split personality. The Lancet, v. 360, n. 9349, p. 1898-1899, 2002. ISSN 0140-6736.

DILLMAN, R. O. Pentostatin (Nipent) in the treatment of chronic lymphocyte leukemia and hairy cell leukemia. Expert Rev Anticancer Ther, v. 4, n. 1, p. 27-36, Feb 2004. ISSN 1473-7140 (Print) 1473-7140 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14748654.

EBRAHIMI-RAD, M. *et al.* Adenosine Deaminase 1 as a Biomarker for Diagnosis and Monitoring of Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. J Med Biochem, v. 37, n. 2, p. 128-133, Apr 2018. ISSN 1452-8258 (Print) 1452-8266 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30581348.

FENG, W. *et al.* High Level P2X7-Mediated Signaling Impairs Function of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. Stem Cell Rev, v. 12, n. 3, p. 305-14, Jun 2016. ISSN 1558-6804 (Electronic) 1550-8943 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27059869.

GADEOCK, S. *et al.* P2X7 receptor activation mediates organic cation uptake into human myeloid leukaemic KG-1 cells. Purinergic signalling, v. 8, n. 4, p. 669-676, 2012. ISSN 1573-9538.

GHADERI, B. *et al.* Adenosine Deaminase Activity in Chronic Lymphocytic Leukemia and Healthy Subjects. Iran J Cancer Prev, v. 9, n. 3, p. e5069, Jun 2016. ISSN 2008-2398 (Print) n2008-2398 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27703646.

GREVER, M. R.; DOAN, C. A.; KRAUT, E. H. Pentostatin in the treatment of hairy-cell leukemia. Best Pract Res Clin Haematol, v. 16, n. 1, p. 91-9, Mar 2003. ISSN 1521-6926 (Print) 1521-6926 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12670468.

HALL, D. A.; HOURANI, S. M. Effects of suramin on increases in cytosolic calcium and on inhibition of adenylate cyclase induced by adenosine 5'-diphosphate in human platelets. Biochem Pharmacol, v. 47, n. 6, p. 1013-8, Mar 15 1994. ISSN 0006-2952 (Print) 0006-2952 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8147900.

HAMBLIN, T. J. *et al.* Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood, v. 94, n. 6, p. 1848-1854, 1999. ISSN 0006-4971.

HICKMAN, S. E. *et al.* P2Z adenosine triphosphate receptor activity in cultured human monocyte-derived macrophages. Blood, v. 84, n. 8, p. 2452-6, Oct 15 1994. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7919365.

HIRATA, Y. *et al.* CD150(high) Bone Marrow Tregs Maintain Hematopoietic

Stem Cell Quiescence and Immune Privilege via Adenosine. Cell Stem Cell, v. 22, n. 3, p. 445-453 e5, Mar 1 2018. ISSN 1875-9777 (Electronic) 1875-9777 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29456159.

HIRATA, Y. *et al.* CD150high CD4 T cells and CD150high Tregs regulate hematopoietic stem cell quiescence via CD73. Haematologica, Dec 13 2018. ISSN 1592-8721 (Electronic) 0390-6078 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30545927.

HOFFMAN, J. F. *et al.* Tetrodotoxin-sensitive Na+ channels and muscarinic and purinergic receptors identified in human erythroid progenitor cells and red blood cell ghosts. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, n. 33, p. 12370-4, Aug 17 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15292511.

HUANG, J. C. *et al.* Mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia bone marrow exhibit aberrant cytogenetics and cytokine elaboration. Blood Cancer J, v. 5, p. e302, Apr 10 2015. ISSN 2044-5385 (Electronic) 2044-5385 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25860293.

IDZKO, M. *et al.* Functional characterization of P2Y and P2X receptors in human eosinophils. J Cell Physiol, v. 188, n. 3, p. 329-36, Sep 2001. ISSN 0021-9541 (Print) 0021-9541 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11473359.

JAIN, S. *et al.* Evaluating New Markers for Minimal Residual Disease Analysis by Flow Cytometry in Precursor B Lymphoblastic Leukemia. Indian J Hematol Blood Transfus, v. 34, n. 1, p. 48-53, jan. 2018. ISSN 0971-4502 (Print) 0971-4502 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29398799.

JOHNSTON, J. B. Mechanism of action of pentostatin and cladribine in hairy cell leukemia. Leuk Lymphoma, v. 52 Suppl 2, p. 43-5, Jun. 2011. ISSN 1029-2403 (Electronic) 1026-8022 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21463108.

KANE, B. J.; KUHN, J. G.; ROUSH, M. K. Pentostatin: an adenosine deaminase inhibitor for the treatment of hairy cell leukemia. Ann Pharmacother, v. 26, n. 7-8, p. 939-47, Jul-Aug 1992. ISSN 1060-0280 (Print)1060-0280 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1504408.

KAY, N. E. *et al.* Cumulative experience and long term follow-up of pentostatin-based chemoimmunotherapy trials for patients with chronic lymphocytic leukemia. Expert Rev Hematol, v. 11, n. 4, p. 337-349, Apr 2018. ISSN 1747-4094 (Electronic) 1747-4094 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29460654.

LEMOLI, R. M. *et al.* Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo. Blood, v. 104, n. 6, p. 1662-70, Sep 15 2004. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161674.

LIM TO, W. K.; KUMAR, P.; MARSHALL, J. M. Hypoxia is an effective stimulus for vesicular release of ATP from human umbilical vein endothelial cells.

Placenta, v. 36, n. 7, p. 759-66, Jul 2015. ISSN 1532-3102 (Electronic) 0143-4004 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25956988.

MEJER, J.; NYGAARD, P. Adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase levels in acute myeloblastic leukemia cells. Relationship to diagnosis and clinical course. Leuk Res, v. 3, n. 4, p. 211-6, 1979. ISSN 0145-2126 (Print) 0145-2126 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/118308.

MIKHAILOV, A. *et al.* CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. J Immunol, v. 181, n. 1, p. 464-75, Jul 1 2008. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566412.

MITCHELL, B. S. *et al.* Biochemical consequences of adenosine deaminase inhibition in vivo. Differential effects in acute and chronic T cell leukemia. Ann N Y Acad Sci, v. 451, p. 129-37, 1985. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3878114.

MOHANTY, J. G. *et al.* Effects of purine and pyrimidine nucleotides on intracellular Ca2+ in human eosinophils: activation of purinergic P2Y receptors. J Allergy Clin Immunol, v. 107, n. 5, p. 849-55, May 2001. ISSN 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344352.

MONTERO, M.; GARCIA-SANCHO, J.; ALVAREZ, J. Biphasic and differential modulation of Ca2+ entry by ATP and UTP in promyelocytic leukaemia HL60 cells. Biochemical Journal, v. 305, n. 3, p. 879-887, 1995. ISSN 0264-6021.

MORISAKI, T.; FUJII, H.; MIWA, S. Adenosine deaminase (ADA) in leukemia: clinical value of plasma ADA activity and characterization of leukemic cell ADA. Am J Hematol, v. 19, n. 1, p. 37-45, May 1985. ISSN 0361-8609 (Print) 0361-8609 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3985005.

MOSAAD ZAKI, E. *et al.* Impact of CD39 expression on CD4+ T lymphocytes and 6q deletion on outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia. Hematol Oncol Stem Cell Ther, Oct 11 2018. ISSN 1658-3876 (Print). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30336122.

MULLER, T. *et al.* The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. Allergy, v. 65, n. 12, p. 1545-53, Dec 2010. ISSN 1398-9995 (Electronic) 0105-4538 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880147.

NAUMOV, A. P. *et al.* ATP-activated Ca(2+)-permeable channels in rat peritoneal macrophages. FEBS Lett, v. 313, n. 3, p. 285-7, Nov 30 1992. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1332883.

NOGUEIRA-PEDRO, A. *et al.* Nitric oxide-induced murine hematopoietic stem cell fate involves multiple signaling proteins, gene expression, and redox modulation. Stem Cells, v. 32, n. 11, p. 2949-60, Nov 2014. ISSN 1549-4918 (Electronic) 1066-5099 (Linking).

Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24964894.

NÜCKEL, H. *et al.* 1513A/C polymorphism in the P2X7 receptor gene in chronic lymphocytic leukemia: absence of correlation with clinical outcome. European journal of haematology, v. 72, n. 4, p. 259-263, 2004. ISSN 0902-4441.

NUTTLE, L. C.; DUBYAK, G. R. Differential activation of cation channels and non-selective pores by macrophage P2z purinergic receptors expressed in Xenopus oocytes. J Biol Chem, v. 269, n. 19, p. 13988-96, May 13 1994. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514597.

ORRISS, I. R. *et al.* Hypoxia stimulates vesicular ATP release from rat osteoblasts. J Cell Physiol, v. 220, n. 1, p. 155-62, Jul 2009. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19259945.

PAREDES-GAMERO, E. J. *et al.* Activation of P2Y1 receptor triggers two calcium signaling pathways in bone marrow erythroblasts. Eur J Pharmacol, v. 534, n. 1-3, p. 30-8, mar. 18 2006. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487961.

PAREDES-GAMERO, E. J. *et al.* P2X7-induced apoptosis decreases by aging in mice myeloblasts. Exp Gerontol, v. 42, n. 4, p. 320-6, Apr 2007. ISSN 0531-5565 (Print) 0531-5565 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17188441.

PAREDES-GAMERO, E. J. *et al.* Problems caused by high concentration of ATP on activation of the P2X7 receptor in bone marrow cells loaded with the Ca2+ fluorophore fura-2. J Fluoresc, v. 14, n. 6, p. 711-22, Nov 2004. ISSN 1053-0509 (Print) 1053-0509 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649023.

PAREDES-GAMERO, E. J. *et al.* Changes in intracellular Ca2+ levels induced by cytokines and P2 agonists differentially modulate proliferation or commitment with macrophage differentiation in murine hematopoietic cells. J Biol Chem, v. 283, n. 46, p. 31909-19, Nov 14 2008. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18775989.

PERRY, C. *et al.* Increased CD39 expression on CD4(+) T lymphocytes has clinical and prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia. Ann Hematol, v. 91, n. 8, p. 1271-9, Aug 2012. ISSN 1432-0584 (Electronic) 0939-5555 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22349724.

PULTE, D. *et al.* CD39 expression on T lymphocytes correlates with severity of disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, v. 11, n. 4, p. 367-72, Aug 2011. ISSN 2152-2669 (Electronic) 2152-2669 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816376.

PULTE, D. *et al.* CD39 activity correlates with stage and inhibits platelet reactivity in chronic lymphocytic leukemia. J Transl Med, v. 5, p. 23, May 4 2007. ISSN 1479-5876 (Electronic) 1479-5876

(Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17480228.

ROSSI, L. *et al.* The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration. Blood, v. 109, n. 2, p. 533-42, Jan 15 2007. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008551.

SALVESTRINI, V. *et al.* Extracellular ATP induces apoptosis through P2X7R activation in acute myeloid leukemia cells but not in normal hematopoietic stem cells. Oncotarget, v. 8, n. 4, p. 5895-5908, Jan 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27980223.

SALVESTRINI, V. *et al.* Purinergic signaling inhibits human acute myeloblastic leukemia cell proliferation, migration, and engraftment in immunodeficient mice. Blood, v. 119, n. 1, p. 217-226, 2012. ISSN 0006-4971.

SAUTER, C.; LAMANNA, N.; WEISS, M. A. Pentostatin in chronic lymphocytic leukemia. Expert Opin Drug Metab Toxicol, v. 4, n. 9, p. 1217-22, Sep 2008. ISSN 1742-5255 (Print) 1742-5255 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18721115.

SCHETINGER, M. R. *et al.* NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. Biofactors, v. 31, n. 2, p. 77-98, 2007. ISSN 0951-6433 (Print) 0951-6433 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806312.

SCHULZE-LOHOFF, E. *et al.* Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. Am J Physiol, v. 275, n. 6, p. F962-71, Dec 1998. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843914.

SEDEK, L. *et al.* Differential expression of CD73, CD86 and CD304 in normal vs. leukemic B-cell precursors and their utility as stable minimal residual disease markers in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. J Immunol Methods, Mar 9 2018. ISSN 1872-7905 (Electronic) 0022-1759 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29530508.

SELLICK, G. S. *et al.* The P2X7 receptor gene A1513C polymorphism does not contribute to risk of familial or sporadic chronic lymphocytic leukemia. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, v. 13, n. 6, p. 1065-1067, 2004. ISSN 1055-9965.

SERRA, S. *et al.* CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. Blood, v. 118, n. 23, p. 6141-52, Dec 1 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998208.

SERRA, S. *et al.* Adenosine signaling mediates hypoxic responses in the chronic lymphocytic leukemia microenvironment. Blood Adv, v. 1, n. 1, p. 47-61, Nov 29 2016. ISSN 2473-9529 (Print) 2473-9529 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29296695.

SLUYTER, R. *et al.* Extracellular ATP increases cation fluxes in human

erythrocytes by activation of the P2X7 receptor. J Biol Chem, v. 279, n. 43, p. 44749-55, Oct 22 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15304508.

SMYTH, J. F. *et al.* Correlation of adenosine deaminase activity with cell surface markers in acute lymphoblastic leukemia. J Clin Invest, v. 62, n. 3, p. 710-2, Sep 1978. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/308513.

STARCZYNSKI, J. *et al.* The P2X7 receptor gene polymorphism 1513 A→ C has no effect on clinical prognostic markers, in vitro sensitivity to fludarabine, Bcl-2 family protein expression or survival in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. British journal of haematology, v. 123, n. 1, p. 66-71, 2003. ISSN 0007-1048.

STEINBERG, T. H.; SILVERSTEIN, S. C. Extracellular ATP4- promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. J Biol Chem, v. 262, n. 7, p. 3118-22, Mar 5 1987. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2950094.

SUH, B. C. *et al.* P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. J Immunol, v. 166, n. 11, p. 6754-63, Jun 1 2001. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359833.

SURPRENANT, A. *et al.* The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). Science, v. 272, n. 5262, p. 735-8, May 3 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8614837.

TEMBHARE, P. R. *et al.* Evaluation of new markers for minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: CD73 and CD86 are the most relevant new markers to increase the efficacy of MRD 2016; 00B: 000-000. Cytometry B Clin Cytom, v. 94, n. 1, p. 100-111, Jan 2018. ISSN 1552-4957 (Electronic) 1552-4949 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27718302.

THUNBERG, U. *et al.* Polymorphism in the P2X7 receptor gene and survival in chronic lymphocytic leukaemia. The Lancet, v. 360, n. 9349, p. 1935-1939, 2002. ISSN 0140-6736.

TUNG, R. *et al.* Adenosine deaminase activity in chronic lymphocytic leukemia. Relationship to B- and T-cell subpopulations. J Clin Invest, v. 57, n. 3, p. 756-61, Mar 1976. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1082452.

TURNER, N. A.; MOAKE, J. L.; MCINTIRE, L. V. Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y(12) and P2Y(1) is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow. Blood, v. 98, n. 12, p. 3340-5, Dec 1 2001. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719372.

WANG, W. *et al.* The application of CD73 in minimal residual disease monitoring using flow cytometry in B-cell acute lymphoblastic leukemia. Leuk Lymphoma, v. 57, n. 5, p. 1174-81, May 2016. ISSN 1029-2403 (Electronic)

1026-8022 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26436205.

WIETEN, E. *et al.* CD73 (5'-nucleotidase) expression has no prognostic value in children with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia, v. 25, n. 8, p. 1374-6, Aug 2011. ISSN 1476-5551 (Electronic) 0887-6924 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760591.

WILEY, J. S. *et al.* A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. The Lancet, v. 359, n. 9312, p. 1114-1119, 2002. ISSN 0140-6736.

WRIGHT, A. *et al.* Impaired P2X1 Receptor-Mediated Adhesion in Eosinophils from Asthmatic Patients. J Immunol, v. 196, n. 12, p. 4877-84, Jun 15 2016. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27183585.

YU, T. *et al.* Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation. Am J Physiol Cell Physiol, v. 298, n. 3, p. C457-64, Mar 2010. ISSN 1522-1563 (Electronic) 0363-6143 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19889958.

ZHANG, L. *et al.* P2X7 polymorphism and chronic lymphocytic leukaemia: lack of correlation with incidence, survival and abnormalities of chromosome 12. Leukemia, v. 17, n. 11, p. 2097, 2003. ISSN 1476-5551.

ZHANG, X.-J. *et al.* Expression of P2X7 in human hematopoietic cell lines and leukemia patients. Leukemia research, v. 28, n. 12, p. 1313-1322, 2004. ISSN 0145-2126.

ZIMMER, J.; KHALIFA, A. S.; LIGHTBODY, J. J. Decreased lymphocyte adenosine deaminase activity in acute lymphocytic leukemia children and their parents. Cancer Research, v. 35, n. 1, p. 68-70, Jan 1975. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1053696.

ZOETEWIJ, J. P. *et al.* The role of a purinergic P2z receptor in calcium-dependent cell killing of isolated rat hepatocytes by extracellular adenosine triphosphate. Hepatology, v. 23, n. 4, p. 858-65, Apr 1996. ISSN 0270-9139 (Print)0270-9139 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8666342.

SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NAS DOENÇAS RENAIS

Laura Nyland Jost
Matheus Ribeiro Bizuti
Débora Tavares de Resende e Silva

INTRODUÇÃO

O metabolismo renal deve-se diretamente ao consumo de oxigênio, o qual está intimamente relacionado à Na/K ATPase (bomba de sódio potássio). Assim, a capacidade restante do metabolismo mitocondrial é dividida entre a produção de energia via trifosfato de adenosina (ATP) e o mecanismo de respiração celular não fosforilativo. Desse modo, a garantia de um adequado funcionamento renal relaciona-se à molécula de ATP e a seus processos metabólicos (Avesani *et al.*, 2004).

Nos rins, a adenosina (ADO) tem um papel fundamental como regulador de *feedback* túbulo-glomerular, além de controlar a liberação da renina, o ritmo de filtração glomerular e o tônus vascular renal. Quando se observam níveis elevados da taxa de hidrólise de ATP em relação à sua síntese, possivelmente têm-se níveis aumentados de adenosina durante os balanços de energia negativa, sendo que o aumento do consumo de ATP, uma perfusão renal comprometida e hipóxia, aumentam a formação de adenosina no rim. Quando se tem níveis aumentados de adenosina, observam-se diferentes insultos renais (Regateiro, Cobbold, Waldmann, 2012).

Quando há um determinado insulto celular, devido a um quadro inflamatório ou dano tecidual, há liberação de ATP para o meio extracelular. Este ATP pode sinalizar receptores purinérgicos, como os receptorores P2 e, com isso, ativar vias pró-inflamatórias. No entanto, a presença das denominadas ectoenzimas na superfície celular pode contribuir para auxiliar a regulação e o metabolismo de ATP e ADO presente no espaço extracelular. No ambiente inflamatório, a ADO extracelular é derivada da conversão enzimática dos precursores nucleotídeos ATP e ADP, através da ectonucleotidase difosfohidrolase1 (CD39) e da subsequente conversão de AMP em adenosina pela ecto5'nucleotidase (CD73), podendo sinalizar através de 4 receptores de ADO distintos: Adora1, Adora2a, Adora2b, Adora3 (Resta, Yamashita, Thompson, 1998).

Sendo assim, neste capítulo, serão abordados tópicos relacionados à fisiopatologia renal, assim como a relação do sistema purinérgico com as doenças renais.

Fisiopatologia renal

Os rins são os órgãos fundamentais para a manutenção da homeostase do corpo humano. Anatomicamente, os rins são divididos em compartimentos corticais e medulares. A porção cortical consiste em uma área contínua que compreende as bases das pirâmides renais e a cápsula renal. É composta por vasos sanguíneos, glomérulos, túbulos proximais e distais de todos os néfrons. Já a porção medular compõe-se por pirâmides de Malpighi, papilas renais, ureter, cálices maiores, cálices menores, raios medulares, alça de Henle, tubos coletores e vasos sanguíneos. As pirâmides renais são responsáveis por coletar a urina formada nos néfrons. Suas bases são voltadas para a periferia, e seus ápices são convergentes ao seio renal. As papilas renais, envolvidas pelo ureter, convergem para os ductos coletores, formando os cálices menores, que se unem e formam os cálices maiores. A partir da base das pirâmides renais, tem-se raios medulares, alça de Henle, tubos coletores e vasos sanguíneos (Drake, Vogl, Mitchel, 2015).

Desse modo, a diminuição progressiva da função renal implica comprometimento de, essencialmente, todos os outros órgãos. Contudo, independentemente da etiologia da doença de base, os principais desfechos em pacientes com doença renal crônica (DRC) são as suas complicações (Bastos, Bregman, Kirsztajn, 2010). Diante do exposto, a DRC é considerada um problema de saúde pública mundial

e, por conta disso, merece nossa atenção. As doenças renais possuem prevalência considerável na população. A DRC apresenta-se em uma a cada dez pessoas na população mundial, contudo, 90% dos acometidos não sabem que apresentam a disfunção renal. É importante salientar que a DRC pode ser desencadeada por diabetes, obesidade, hipertensão arterial, tabagismo, dentre outras comorbidades (Associação Brasileira dos Centros de Diálise de Transplantes, 2017).

Segundo a *National Kidney Foundation* - K/DOQI (2002), a DRC é definida como a presença de lesão renal ou diminuição do nível da função renal por três meses ou mais, bem como por anormalidades estruturais ou funcionais do rim, com ou sem diminuição da filtração glomerular (FG) (< 60mL/min/1,73m2). Além disso, a DRC é identificada por meio de anormalidades histopatológicas ou de marcadores de lesão renal, incluindo alterações sanguíneas ou urinárias. Dentre os tratamentos, as opções de escolha são diálise peritoneal, hemodiálise e transplante renal. Dessa forma, a escolha da melhor modalidade de tratamento deve contemplar a análise das condições clínicas, psicológicas e financeiras do paciente (Flores, Thomé, 2004).

A DRC acomete diferentes sistemas: sistema neurológico (sonolência, letargia, irritabilidade, tremores, câimbra, déficit cognitivo, soluço e fraqueza muscular); sistema gastrointestinal (náusea, vômito, anorexia, hemorragia, hálito urêmico, diarréia e gastrite); sistema cardiovascular (dispnéia, arritmia, hipertensão, edema e tosse); sistema endócrino (acidose metabólica, galactorreia, impotência, perda de peso, hiperuricemia, diminuição da libido e hipercalemia); sistema hematológico (sangramentos e anemias) e sistema urinário (oligúria e noctúria) (National Kidney Foundation, 2013).

A insuficiência renal não tratada é responsável por desencadear um milhão de mortes por ano na população mundial. Estimativas apontam que esse valor tende a aumentar, uma vez que o tabagismo, a ingestão excessiva de sódio e a pouca hidratação farão parte da cultura hodierna (Associação Brasileira dos Centros de Diálise de Transplantes, 2017). Já a insuficiência renal aguda (IRA) é responsável por uma incidência de 2147 a 4085 casos por milhão de habitantes em países desenvolvidos. Estudos apontam que, a cada ano, por volta de dois milhões de pessoas morrem de IRA. Além disso, os pacientes sobreviventes a IRA possuem maior predisposição a desenvolver DRC (Li; Burdmann; Mehta, 2013).

A insuficiência renal consiste em alterações na capacidade de filtração dos rins, e substâncias, como a ureia e a creatinina, acumulam-se no organismo do

paciente. A IRA é caracterizada pela diminuição da capacidade de filtração renal por horas ou dias (Yu *et al.*, 2007). A IRA pode ser classificada em: IRA pré-renal – que contempla IRA renal, necrose tubular aguda (NTA) séptica, NTA nefrotóxica, IRA por glomerulopatias, IRA por nefrite intersticial aguda, IRA vascular, embolização por colesterol e IRA hepatorenal; e IRA pós-renal (Wald, 2014). Diferentemente da IRA, a DRC consiste em múltiplas alterações laboratoriais e clínicas de caráter persistente e irreversível ao rim (Rosenberg, 2003).

A IRA manifesta-se em diferentes sistemas orgânicos, desencadeando manifestações clínicas distintas no sistema digestório (inapetência, náuseas, vômitos incoercíveis e sangramento digestivo), no sistema cardiorrespiratório (dispneia, edema, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, edema agudo de pulmão, arritmias, pericardite e pleurite), no sistema neurológico (sonolência, tremores, agitação, torpor, convulsão e coma), no sistema hematológico (sangramentos, anemias e distúrbios plaquetários), no sistema imunológico (imunossupressão e predisposição a infecções), no sistema nutricional (aumento do catabolismo e perda de massa muscular) e no sistema cutâneo (prurido) (Costa, 1997; Yu *et al.*, 2007).

Existem diferentes mecanismos para o tratamento clínico da IRA. Faz-se necessário garantir um volume intravascular expandido, bem como pressão arterial média acima de 80 mmHg (Mehta *et al.*, 2007). Ademais, deve-se evitar o excesso de hidratação do paciente, pois, assim, se diminui o risco de formação de edemas. O controle nutricional do paciente com IRA é fator imprescindível para manutenção de um quadro clínico controlável, haja vista que a elevação do nível de creatinina pode predispor a necessidade de tratamento por diálise. Além disso, a subnutrição está associada a maior incidência de complicações, como maior tempo de internação e maiores índices de mortalidade (Palevsky, 2007).

Em situações em que o comprometimento renal está muito avançado, faz-se mister o tratamento com hemodiálise ou diálise peritoneal. Recomenda-se o tratamento dialítico sobre os seguintes aspectos: hiperpotassemia (acima de 5,5 mE/L com alterações ao eletrocardiograma (ECG); hipervolemia (edema periférico, derrame pleural e pericárdico, hipertensão arterial, ascite e insuficiência cardíaca congestiva); uremia, ocasionando danos ao sistema nervoso central, como sonolência, coma, convulsões e tremores; acidose metabólica grave e outras situações (Yu *et al.*, 2007).

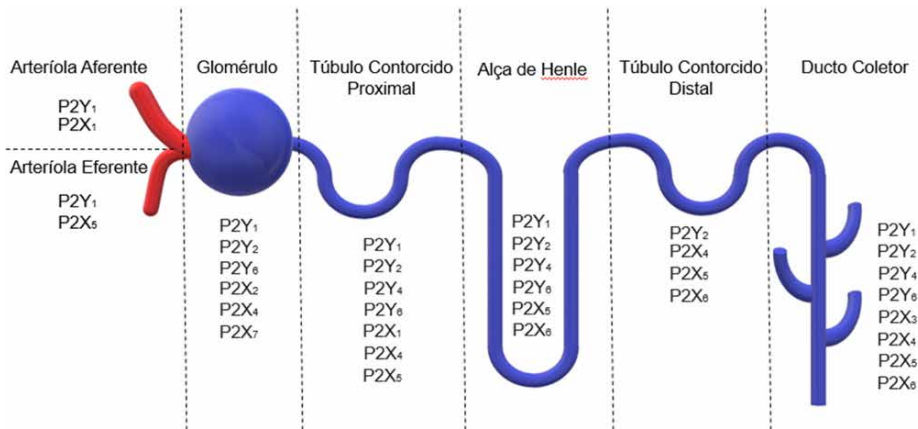
Receptores purinérgicos e envolvimento renal

O ATP é uma molécula responsável por fornecer energia para os mais variados processos do metabolismo celular. Existente em todas as células, o ATP é uma molécula sinalizadora do sistema purinérgico, o qual atua como regulador dos mecanismos fisiopatológicos no ambiente extracelular (Burnstock, 2007). O sistema purinérgico está envolvido em diversos processos no organismo humano, como secreção endócrina e exócrina, processo inflamatório, mecanismo de dor, agregação plaquetária, resposta imune e diferenciação celular (North, 2002). Existem dois tipos de receptores purinérgicos, classificados em P1 e P2. Os receptores P1 promovem respostas celulares através da ação da ADO; já os receptores P2, do ATP.

Sabe-se que as células renais possuem ectonucleotidases, que são responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares, interagindo com receptores purinérgicos através da liberação de interleucina 1 beta (IL-1b) e interleucina-18 (IL-18). Assim, a estimulação dessas células pode acontecer concomitantemente a processos inflamatórios e anti-inflamatórios, bem como pode estar ligada à necrose e apoptose celular (Menzies *et al.*, 2017).

Na região onde se localiza o túbulo proximal, observa-se o receptor P2Y1 inibindo a reabsorção de bicarbonato e, nesse mesmo local, o ATP possui o efeito contrário. Dessa forma, ocorre a diminuição da concentração plasmática de bicarbonato e, consequentemente, do pH sanguíneo. Já em relação aos receptores P2Y2, localizados apicalmente, observa-se um comportamento de inibição da condução de íons potássio. Além disso, linhas de células de tecido nativas, geralmente apicais, inibem a reabsorção de sódio. Consequentemente, o processo de filtração renal fica comprometido, acentuando o quadro de insuficiência renal. Logo, P2Y e P2X possuem funções inibitórias e excitatórias (Turner; Elliott; Tam, 2009).

No receptor P2X1, localizado na arteríola aferente, local de entrada sanguínea para o glomérulo, conforme apresentado na Figura 1, ocorre o processo de promoção da vasoconstrição, contribuindo, assim, com o mecanismo de *feedback* túbulo glomerular, o qual consiste na regulação do fluxo sanguíneo, nesta arteríola, a partir da concentração de cloreto de sódio fora da alça de Henle. Assim, esse receptor atua como modulador do *feedback* túbulo glomerular (Unwin; Bailey; Burnstock, 2003).

Figura 1: Receptores purinérgicos em toda extensão do néfron

Fonte: autores (2019).

Observou-se que, no ducto coletor, os receptores P2 atuam na inibição do transporte de água. Isso ocorre em concentrações baixas de ATP, devido à inibição da arginina vasopressina, referida também como hormônio antidiurético humano e secretada pela neuroipófise. Dessa forma, a excreção de líquidos fica diminuída. Esse quadro pode ser favorável no início da DRC, no qual há frequentemente filtração glomerular aumentada. Contudo, com o avanço da doença, a filtração torna-se diminuída, fazendo com que a ação dos receptores P2 agravem o quadro da doença (Unwin; Bailey; Burnstock, 2003; Bastos; Bregman; Kirsztajn, 2009).

Em alguns estudos, verificou-se que o ATP das células renais é liberado no epitélio do túbulo renal, bem como na mácula densa, o que permite a regulação da taxa de filtração glomerular e, consequentemente, do volume celular (Hillman; Burnstock; Unwin, 2005).

No compartimento cortical, mais diretamente no glomérulo, a expressão de P2X é escassa no rim normal, mas na inflamação crônica – que, muitas vezes, está presente na DRC – ocorre uma regulação positiva. Além disso, ele também atua nas respostas imunes, na ativação da fosfolipase D e na liberação de L-selectina. A liberação de citocinas é expressiva, proporcionando, assim, um quadro inflamatório (Hillman, Burnstock, Unwin, 2005). Foi observado que quando o tecido renal é lesado, por qualquer doença ou de outra forma, ocorre o aumento

da concentração de ATP, provocando a ativação dos receptores P2, que podem desencadear uma lesão glomerular, além de danos às células vasculares renais, desencadeando uma condição inflamatória (Menzies *et al.*, 2017).

Dessa forma, quando há um processo de lesão renal, o ATP extracelular liberado sinaliza os receptores P2, os quais ativam vias pró-inflamatórias. Todavia, as ectoenzimas presentes na superfície celular são capazes de modular e metabolizar o ATP e a adenosina no ambiente extracelular. Para mais, a sinalização celular mediante CD39, por meio do receptor de ADO Adora2, é responsável por proteger as células renais após lesão renal isquêmica. Os receptores Adora2 estão presentes no epitélio tubular e nas células mesangiais. Estudos indicam que a ativação dos receptores Adora2 é fator de redução de injúria renal provocada pela síndrome da isquemia e reperfusão, uma vez que tais receptores modulam a atuação de células do sistema imunitário (Yap; Lee, 2012). A adenosina e a enzima heme oxigenase 1 (HO-1) possuem ação regulatória do sistema imune em casos de injúria renal, haja vista que atuam na inibição do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e na estimulação da produção de interleucina-10 (IL-10). Para mais, em condições de hipóxia, o fator induzido por hipóxia (HIF-1α) permite alterações significativas nas células e nos tecidos lesados, a saber: aumento da angiogênese. Assim, HIF-1α atua eficazmente em casos de choque hemorrágico, lesão por hipóxia e estresse oxidativo (Okusa, 2002).

Sendo assim, os receptores P2 são de fundamental importância para a função vascular renal, pois regulam a resistência pré-glomerular e se autorregulam. Além disso, o receptor P2Y é o responsável por mediar o processo de vasodilatação via óxido nítrico. Diferentemente, os receptores P2X são responsáveis pelo processo de vasoconstrição (Inscho, 2009). Outrossim, o receptor P2Y12 atua na formação de eventos aterotrombóticos. Estudos indicam que a inibição de P2Y12 atua na prevenção secundária de eventos aterotrombóticos após síndrome coronariana aguda em pacientes com doença renal crônica (Desai *et al.*, 2017). A resistência vascular renal é regulada pelo ajuste da arteríola aferente, que é diretamente influenciada pelo ATP, principalmente nos receptores P2X, desencadeando um processo de vasoconstrição, dificultando o processo de filtração glomerular (Inscho, 2009).

Outro fator importante para o processo de vasoconstrição das arteríolas aferentes é o influxo de cálcio, que se deve, entre outros fatores, à ativação dos receptores P2X (Inscho, 2009). A liberação de IL-1b e ativação de NFkapaB e do

fator nuclear de células T ativadas (NFAT) possuem relação com o processo de apoptose e morte celular, que ocorrem nas células que expressam o P2X7 endógeno – células dendríticas, linfócitos, macrófagos, células microgliais e células mesangiais renais. A ativação de P2X7 pode causar proliferação de linfócitos. Outrossim, a importância da função do P2X7 não é clara (Hillman; Burnstock; Unwin, 2005). Além disso, o P2X7 é a subunidade responsável pelas citocinas pró-inflamatórias que promovem a apoptose (Turner; Elliott; Tam, 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que a DRC promove um estado constante de inflamação, o sistema purinérgico atua expandindo-a. Além disso, ao promover apoptose, proporciona maior liberação de ATP pelas células lesadas. Isso leva a um ciclo de degradação em um tecido já comprometido, acentuando a deficiência no processo de filtração renal (Nahas; Bello, 2005). Estudos também demonstram que a prática de exercícios físicos de resistência em pacientes com DRC auxilia na redução da hidrólise do ATP, o que propicia uma redução no processo inflamatório das células renais, atenuando a expressão do sistema purinérgico (Silveira *et al.*, 2018).

Na IRA, a inflamação pode ser benéfica no combate a alguns patógenos, por exemplo. No entanto, isso ainda causa morte celular e, portanto, suas vantagens devem ser ponderadas (Eddy, 2005; Cheung; Paik; Mak, 2010). Como o sistema purinérgico causa inflamação, há envolvimento do sistema imunológico. Quando isso provoca uma resposta imune exacerbada, o processo inflamatório pode levar à perda da tolerância periférica às moléculas liberadas pelo próprio tecido, sendo reconhecidas como antígenos. Esse processo leva a um quadro inflamatório crônico que causa dano celular (Moss *et al.*, 2004).

Destarte, tanto na IRA quanto na DRC, a atuação do sistema purinérgico pode favorecer o curso inflamatório, o qual elevaria os danos às células renais, haja vista que P2X7 é responsável pela quimiotaxia de linfócitos e, consequentemente, indução da produção de citocinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, os receptores Adora2 atuam na supressão da resposta imune, uma vez que a adenosina e a HO-1 estimulam a liberação de IL-10, bem como a inibição de TNF-α, fator benéfico em casos de lesões por isquemia (Nahas; Bello; 2005; Turner; Elliott; Tam, 2009).

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CENTROS DE DIÁLISE DE TRANSPLANTES (Brasília) (org.), 2017. Sociedade Internacional de Nefrologia Alerta Para Epidemia "Silenciosa" de Doença Renal Crônica. Disponível em: http://www.abcdt.org.br/sociedade-internacional-de-nefrologia-alerta-para-epidemia-silenciosa-de-doenca-renal-cronica/. Acesso em: 18 mar. 2019.

AVESANI, C. M.; DRAIBE, S. A.; KAMIMURA, M. A.; DALBONI, M. A.; COLUGNATI, F. A.; CUPPARI, L. Decreased resting energy expenditure in non-dialysed chronic kidney disease patients. Nephrol Dial Transplant. 2004; 19:3091-7.

BASTOS, M. G.; BREGMAN, R; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. Associação Médica Brasileira, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 248-253, 08 nov. 2009.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. Cell Mol. Life Sci., v. 64, n. 12, p. 1471-1483, 2007.

CHEUNG, W. W.; PAIK, K. H.; MAK, R. H. Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. Pediatr Nephrol. 2010; 25:711-24.

COSTA M. C.; YU L. Insuficiência Renal Aguda. Ars Curandi 30(2): 115-121, 1997.

DESAI, R. J.; SPOENDLIN, J; MOGUN, H; GAGNE, J. J. Contemporary Time Trends in Use of Antiplatelet Agents Among Patients with Acute Coronary Syndrome and Comorbid Diabetes Mellitus or Chronic Kidney Disease. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, [s.l.], v. 37, n. 10, p.1322-1327, 19 set. 2017. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/phar.2018.

DRAKE, R. L.; VOGL, A. W.; MITCHEL, A. W. M. Gray's anatomia clínica para estudantes. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

EDDY A. A. Progression in chronic kidney disease. Adv Chronic Kidney Dis. 2005;12:353-65.

FLORES, R. V.; THOMÉ, E. G. da R. Percepções do paciente em lista de espera para o transplante renal. Revista Brasileira de Enfermagem, [s.l.], v. 57, n. 6, p. 687-690, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO).

HILLMAN, K. A.; BURNSTOCK, G; UNWIN, R. J. The P2X7 ATP Receptor in the Kidney: A Matter of Life or Death?. Nephron Experimental Nephrology, [s.l.], v. 101, n. 1, p. 24-30, 30 maio 2005. S. Karger AG. http://dx.doi.org/10.1159/000086036.

INSCHO, E. W. ATP, P2 receptors and the renal microcirculation. Purinergic Signalling, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 447-460, 18 mar. 2009. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/s11302-009-9147-1

K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. Am J Kidney Dis. 2002; 39: (Suppl 2): S1-S246.

LI, P. K. T.; BURDMANN, E. A.; MEHTA, R. L. Injúria renal aguda: um alerta global. 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/jbn/v35n1/v35n1a01.pdf. Acesso em: 14 mar. 2019.

MEHTA, R. L.; KELLUM, J. A.; SHAH, S. V.; MOLITORIS, B. A.; RONCO, C; WARNOCK, D. G.; LEVIN, A. Acute Kidney Injury Network (AKIN): report of

an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. Crit Care. 2007; 11:R31-38.

MENZIES, R. I.; TAM, F. W.; UNWIN, R. J.; BAILEY, M. A. Purinergic signaling in kidney disease. Kidney International, [s.l.], v. 91, n. 2, p. 315-323, fev. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.08.029.

MOSS, R. B.; MOLL, T.; EL-KALAY, M.; KOHNE, C.; SOO HOO W., ENCINAS J. *et al.* Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. Expert Opin Biol Ther. 2004;4:1887-96.

NAHAS, A. M.; BELLO, A. K. Chronic Kidney Disease: The Global Challenge. The Lancet, 365 (22): 331-340, 2005.

National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for the evaluation and management of chronic kidney disease. Kidney International Supplements (2013), v3.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. Physiol. Rev., v. 82, n. 4, p. 1013-1067, 2002.

OKUSA, M. D. A. Adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease. Am. J. Physiol. Renal Physiol., v. 282, n.1, p.F10-18, 2002.

PALEVSKY P. M. Clinical Review: Timing and dose of continuous renal replacement therapy in acute kidney injury. Critical Care 2007; 11:232-237

REGATEIRO, F. S.; COBBOLD, S. P.: WALDMANN, H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. Clin. Exp. Imunnol., v. 171, n. 1, p. 1-7, 2012.

RESTA, R.; YAMASHITA, Y.; THOMPSON, L. F. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. Imunnol. Rev., vol. 161, n. p. 95-109, 1998

ROSENBERG, M. Overview of the management of chronic kidney disease in adults. [Internet]. Waltham (MA): UpToDate, Inc., 2014. [atualizada em 31 jan 2013; acesso em 02 mar. 2019].

SILVEIRA, M. P.; MÂNICA, A.; SOUZA, J. V. G.; KRILOW, C.; AMBROSI, P. A. C.; SIEPKO, C. M.; BONADIMAN, B. S. R.; BAGATINI, M. G.; SILVA, D. T. R. Exercise Changes Oxidative Profile and Purinergic Enzymes Activity in Kidney Disease. American Journal of Sports Science. Vol. 6, No. 4, 2018, p. 175-181. Doi: 10.11648/j.ajss.20180604.17.

TURNER, C. M.; ELLIOTT, J. I.; TAM, F. W. K. P2 receptors in renal pathophysiology. Purinergic Signalling, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 513-520, 9 jun. 2009. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/s11302-009-9153-3.

UNWIN, R. J.; BAILEY, M. A.; BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling Along the Renal Tubule: The Current State of Play. Physiology, [s.l.], v. 18, n. 6, p. 237-241, dez. 2003. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/nips.01436.2003.

WALD, R. Urinalysis in the diagnosis of kidney disease. [Internet]. Waltham (MA): UpToDate, Inc., 2014. Acesso em: 02 mar. 2019.

YAP, S. C.; LEE, H. T. Adenosine and protection from acute kidney injury. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens., v. 21, n.1, p. 24-32, 2012.

YU, L; SANTOS, B. F. C.; BURDMANN, E. A.; SUASSUNA, J. H. R; BATISTA, P. B. P. Diretrizes da AMB Sociedade Brasileira de Nefrologia: insuficiência renal aguda. 2007. Disponível em: https://arquivos.sbn.org.br/uploads/Diretrizes_Insuficiencia_Renal_Aguda.pdf. Acesso em: 02 mar. 2019.

HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

Mateus Marra
Andréia Machado Cardoso
Leandro Henrique Manfredi

INTRODUÇÃO

Hipertensão (HTN) é uma condição crônica que foi classificada, por muito tempo, como valor de pressão sanguínea sustentada igual ou acima de 140/90 mmHg. No entanto, esses parâmetros mudaram; recentemente, de acordo com o Colégio Americano de Cardiologia/ Associação Americana do Coração (American College of Cardiology/American Heart Association), a hipertensão agora é definida como pressão sanguínea sistólica (PS) maior ou igual a 130 mmHg e/ou pressão sanguínea diastólica (PD) maior ou igual a 80mmHg (Whelton *et al.*, 2018).

Desse modo, a hipertensão é classificada, de acordo com o valor da pressão sanguínea, em dois estágios: 1 – pacientes com pressão sanguínea sistólica de 130 a 139 mmHg e/ou pressão sanguínea diastólica de 80 a 89 mmHg; 2 – pressão sanguínea sistólica maior ou igual a 140 mmHg e/ou pressão sanguínea diastólica maior ou igual a 90mmHg. Quando um paciente possui pressão sanguínea sistólica entre 120 mmHg e 129 mmHg e pressão diastólica menor do que 80, sua pressão é considerada elevada, sendo o termo pré-hipertensão muito comum e usado para descrever esta última condição (Whelton *et al.*, 2018).

Essa condição de elevada pressão sanguínea, que acomete aproximadamente um terço dos adultos, representa um imenso problema de saúde, uma vez que afeta milhões de pessoas de todo o mundo, provoca grande impacto na economia

e é o principal fator de risco para eventos cardiovasculares, acidente vascular cerebral (AVC), falência renal e outras complicações. São alguns fatores de risco para se desenvolver hipertensão: gênero, idade, álcool, doença aterosclerótica, tabagismo e sedentarismo. Aproximadamente, 7.5 milhões de mortes (12,8%) ocorrem devido à HTN, e estima-se que haja, em 2025, cerca de 1.56 bilhões de adultos hipertensos. É importante destacar que a hipertensão é mais comum em pessoas negras, as quais são, particularmente, vulneráveis a AVCs e doença renal hipertensiva (Singh; Shankar; Singh, 2017; Weber *et al.*, 2013). A hipertensão também contribui para o desenvolvimento de aterosclerose, visto que a pressão sanguínea elevada pode desencadear uma disfunção endotelial (Wu *et al.*, 2017).

A HTN pode ser dividida em primária ou secundária. A hipertensão primária (também chamada essencial) inclui 95% dos adultos com pressão sanguínea elevada, e sua etiologia não é conhecida, mas envolve tanto fatores genéticos, como uma hiperativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, quanto ambientais, como ingestão de sal em excesso, obesidade e sedentarismo. A hipertensão secundária é responsável por, aproximadamente, 5% de todos os casos de HTN e ocorre quando há uma causa que possa ser identificada, como doença renal crônica, estenose da artéria renal, secreção excessiva de aldosterona, feocromocitoma e apneia do sono (Weber *et al.*, 2013).

Já é bem estabelecido que o sistema purinérgico (SP) está diretamente associado a várias doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão. Nesse sentido, diversas revisões acerca da sinalização purinérgica na fisiopatologia cardiovascular estão disponíveis, incluindo funções fisiológicas dos purinorreceptores cardíacos P2X e P2Y (Burnstock; Pelleg, 2014), função da adenosina na saúde e na doença (Headrick *et al.*, 2013), efeitos do ATP e da adenosina sobre os miócitos das coronárias (Mustafa *et al.*, 2009), vias de degradação das purinas no miocárdio (Manfredi; Holmes, 1985), controle neural não colinérgico e não adrenérgico do miocárdio atrial (Rubino, 1993), reflexo vagal cardiovascular (Pelleg, 1987). Assim, este capítulo faz uma análise acerca da sinalização purinérgica e sua relação com a fisiopatologia da HTN, tendo em vista que as enzimas e os receptores desse sistema podem representar novos alvos para o tratamento da hipertensão.

Papel do sistema purinérgico no coração e nos vasos sanguíneos

Sabe-se que vários parâmetros do sistema cardiovascular determinam a pressão arterial (PA), incluindo o volume sanguíneo, o débito cardíaco (a quantidade de sangue bombeado pelo coração em um minuto) e o balanço do tônus arterial, o qual depende do volume intravascular e de sistemas neuro-humorais. Para que a pressão arterial seja mantida em níveis fisiológicos, ocorre uma interação complexa entre vários componentes do sistema neuro-humoral, o qual inclui o sistema renina-angiotensina-aldosterona, as funções dos peptídeos natriuréticos e do endotélio, o sistema nervoso simpático e o sistema imunológico. Qualquer componente desse sistema neuro-humoral que apresente uma disfunção pode levar a um aumento da PA (Oparil *et al.*, 2018).

Coração

Os quatro tipos dos receptores P1 (adenosina) estão expressos nos cardiomiócitos e regulam a cardioproteção. A ativação dos receptores purinérgicos A1 nos cardiomiócitos promove efeitos cronotrópicos e dromotrópicos negativos e inibição da atividade simpática (Yang; Chen; Fredholm, 2009; Koeppen; Eckle; Eltzschig, 2009; Burnstock; Pelleg, 2014). Os receptores A2A estão envolvidos na regulação da contração dos cardiomiócitos (Monahan *et al.*, 2000).

Todos os subtipos dos receptores P2X estão presentes nos cardiomiócitos, bem como os receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11 (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004). Pustovit *et al.* (2016) elucidaram que os receptores purinérgicos P2, nos cardiomiócitos, estão envolvidos na regulação das atividades elétricas e contráteis cardíacas. De fato, uma ativação dos receptores P2X4 e P2Y11 pelo ATP aumenta a contratilidade do cardiomiócito (Hu *et al.*, 2002; Balogh *et al.*, 2005). Os receptores P2Y dos cardiomiócitos modulam a atividade dos canais K-ATP (Oketani *et al.*, 2002). É sugestivo que os receptores P2 estejam envolvidos na regulação intracelular do íon cálcio, o que pode interferir na sincronização intercelular dos cardiomiócitos (Nakayama *et al.*, 2007). A adenosina e o ATP também parecem inibir a função marca-passo do nó sinoatrial (SA) e a automaticidade das fibras de His e Purkinje (Szentmiklósi *et al.*, 1980; Pelleg *et al.*, 1990). Contudo, de acordo com Lei-ming *et al.* (2003), os receptores P2X1 e

P2Y2 presentes no nó SA não são funcionais, o que excluiria a atividade do ATP sobre essa estrutura.

É bem aceito que há um controle reflexo do sistema cardiovascular, o qual também pode ser regulado pelo SP. Nesse sentido, o ATP ativa os receptores P2X2/3 localizados nas terminações nervosas vagais do ventrículo esquerdo e desencadeia um reflexo vagal, o que culmina na inibição dos nós sinoatrial e atrioventricular (Burnstock, 2017).

Vasos sanguíneos

O tônus vascular é controlado tanto pelos nervos perivasculares do sistema nervoso autonômico quanto pelas células musculares lisas associadas ao endotélio vascular (Burnstock, 2010). Nesse sentido, o ATP liberado das terminações simpáticas promove uma ação contrátil, principalmente, por meio da ativação dos receptores P2X1 das células musculares lisas associadas ao endotélio vascular (Burnstock 2017). Reho et. al (2015) mostraram que o ATP liberado pelos terminais simpáticos elevou o tônus vascular no plexo mesentérico arterial de suínos.

As células endoteliais, através da liberação de óxio nítrico (NO), promovem o relaxamento das células musculares lisas dos vasos sanguíneos e possuem, por essa razão, um papel importante para equilibrar os efeitos vasoconstritivos causados pela liberação neural de ATP e noradrenalina. Por outro lado, quando há um estresse de cisalhamento, eritrócitos, plaquetas, células imunes e endotélio também liberam ATP, que ativa os receptores P2 no endotélio, o que igualmente leva à liberação de NO. Este último atua nas células musculares lisas para promover relaxamento e, consequentemente, vasodilatação (Burnstock, 2017). Os receptores purinérgicos mais encontrados nas células endoteliais tanto de humanos quanto de animais são os receptores P2Y1 e P2Y2, bem como A2A e A2B, de acordo com Burnstock (2009). No entanto, pode haver uma variação na expressão de receptores a depender da espécie e/ou leito anatômico dos vasos sanguíneos (Burnstock; Ralevic, 2013). De acordo com Burnstock (2017), o ATP pode causar vasodilatação se o endotélio estiver saudável, ou vasoconstrição, via receptores P2 de músuclo vascular liso, caso haja um dano endotelial.

Somado a isso, é estabelecido que terminações nervosas simpáticas, eritrócitos, plaquetas, células endoteliais e músculo liso danificado liberam ATP, o qual

promove proliferação de músculo liso vascular (diminui o diâmetro do vaso e, portanto, aumenta a resistência periférica). ADP liberado pelas plaquetas também age de maneira sinérgica com fatores de crescimento e leva a uma proliferação de músculo liso, em locais de injúria vascular. De fato, os receptores P2Y2 e P2Y4, responsivos a ATP e UTP, promoveram proliferação de células músculares lisas aórticas de ratos (Burnstock, 2017).

Sinalização purinérgica e hipertensão

Na HTN, há um aumento da atividade simpática que inerva os vasos sanguíneos, bem como hiperplasia e hipertrofia de vasos arteriais. Desse modo, o ATP liberado dos nervos simpáticos, como coneurotransmissor junto à noradrenalina, ativa os receptores P2X1 e promove contração do músculo liso (Burnstock, 2015). De fato, uma liberação elevada de ATP como um coneurotransmissor simpático relacionado à noradrenalia foi reportada em ratos espontaneamente hipertensos (Rodrigues *et al.*, 2013). Antigamente, a guanetidina foi usada para o tratamento da hipertensão, provavelmente porque inibe a liberação de ATP e noradrelania das terminações nervosas simpáticas. Além disso, em ratos espontaneamente hipertensos, a vasoconstrição de artérias caudais, em resposta à estimulação nervosa simpática, é inibida pela dessensibilização dos receptores P2X1. Em um estudo de Zhou *et al.* (2016), uma inibição do receptor P2X1 levou a uma diminuição da constrição vascular na aorta de ratos. A hemodinâmica glomerular foi restaurada após a administração de um antagonista do receptor P2X1 em ratos infundidos com angiotensina II (Franco *et al.*, 2017). Assim, os antagonistas dos receptores P2X1 são promissores para o tratamento da hipertensão.

Quando ocorre um estresse de cisalhamento em resposta a mudanças do fluxo sanguíneo, ATP é liberado das células endoteliais (Bodin; Burnstock, 2001) e atua nos receptores P2Y1, P2Y2 e P2X4 dessas células, liberando NO, o que resulta em vasodilatação e queda da pressão arterial (Wang *et al.*, 2015). De fato, uma ativação do receptor P2Y2 desencadeou uma queda na pressão sanguínea em modelos pré-clínicos, segundo Rieg *et al.* (2015). Dessa forma, agonistas dos receptores P2Y1, P2Y2 e P2X4 representam outro mecanismo anti-hipertensivo.

Sabe-se que a atividade nervosa simpática é mediada por purinoreceptores localizados nos neurônios do tronco cerebral e hipotálamo (Gourine; Wood;

Burnstock, 2009). Nesse sentido, hipóxia no tronco cerebral provoca liberação de ATP, resultando em ativação central dos neurônios simpáticos, o que causa aumento da pressão arterial sistêmica (Marina *et al.*, 2015). Assim, antagonistas desses purinoreceptores reduzem a atividade nervosa simpática, causando vasodilatação, e são, por esse motivo, drogas de ação central potenciais para tratamento da hipertensão.

Há um aumento da expressão dos receptores P2X3 nos neurônios quimiorreceptores em modelos pré-clínicos de ratos espontaneamente hipertensos. Nesse sentido, antagonistas dos receptores P2X3 têm demonstrado um efeito de inibição da atividade nervosa simpática através da sensibilidade reflexa aumentada dos quimiorreceptores periféricos envolvendo o corpo carotídeo (Pijacka *et al.*, 2016). De fato, microinjeções do antagonista seletivo do receptor P2X3, α,β-meATP, na região dorsal do bulbo, elevaram o fluxo sanguíneo da artéria carótida comum (Hung *et al.*, 2015). Desse modo, antagonistas do receptor P2X3 também são uma alternativa a ser explorada para o tratamento da hipertensão.

Há fortes indícios de que o receptor P2X7, expresso principalmente em células imunes, bem como no parênquima renal, desempenhe um papel importante no desenvolvimento da hipertensão. Isso ocorre, provavelmente, porque uma estimulação do receptor P2X7 gera uma ação pró-inflmatória, levando à liberação de IL-1 beta, IL-18 dos macrófagos e IL-2 das células T (Ji *et al.*, 2011). Antagonistas do receptor P2X7 reduziram a pressão sanguínea em ratos tratados com angiotensina II e em ratos Dahl hipertensos sensíveis ao sal (Menzies *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2011). Uma maior expressão do receptor P2X7 foi vista nos glomérulos de ratos transgênicos hipertensos, quando comparados a ratos normais (Vonend *et al.*, 2004). A hemodinâmica glomerular foi restaurada quando se administrou um antagonista dos receptores P2X7 em ratos infundidos com angiotensina II (Franco *et al.*, 2017).

Observou-se também que a adenosina, atuando sobre receptores do tipo A3, induz vasodilatação coronariana e, em corações de ratos espontaneamente hipertensos, esses receptores apresentam uma redução de sua expressão. Isso justifica uma resposta vasodilatadora atenuada, em vasos coronarianos, aos agonistas dos receptores A3. Assim, é bastante sugestivo que o receptor A3 desempenhe um papel fundamental na fisiopatologia da HTN e que os agonistas desse receptor sejam promissores para o tratamento dessa condição (Ho; Low; Rose'meyer, 2016).

Nesses cenários descritos, a magnitude da sinalização purinérgica depende do balanço entre ATP gerado e ATP degradado, e uma alteração nesse equilíbrio pode levar a um desequilíbrio e contribuir para o desenvolvimento da HTN, por exemplo. Nesse sentido, após ser liberado e se ligar a receptores específicos, o ATP e outros nucleotídeos sofrem degradação pelas enzimas ectonucleotidases, as quais estão localizadas na membrana celular com seu sítio ativo voltado para o meio extracelular (Yegutkin, 2014; Robson; Sévigny; ZIMMERMANN, 2006; VIRGILIO, 2012). Estão incluídas nessa classe de enzimas a ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (ENTPDase/CD39/NTPDase1), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) e ecto-5´-nucleotidase (CD73/E-5´-nucleotidase). O ATP e o ADP são hidrolisados pela E-NTPDases e E-NPPs a adenosina monofosfato (AMP), a qual, por sua vez, é hidrolisada a adenosina pela CD73. Essa adenosina formada pode ser deaminada, através da enzima adenosina deaminase (ADA), e formar inosina (Colgan *et al.*, 2006; Virgilio, 2012).

Por exemplo, o exercício aeróbico moderado tem se mostrado eficaz para atenuar o processo inflamatório causado pela hipertensão. Parte desse processo envolve o bloqueio do aumento das atividades enzimáticas da ecto-NTPDase e adenosina deaminase (ADA), bem como a elevação da pressão sanguínea, mantendo esses parâmetros equivalentes aos do grupo controle (Cardoso *et al.*, 2015). O exercício físico impediu um aumento na expressão dos receptores A2A e das enzimas CD39 (NTPDase 1) e CD37 (ecto-5-nucleotidase) no cortéx e hipocampo de ratos hipertensos e preveniu a perda de memória vista em modelos hipertensos (Cardoso *et al.*, 2018). Os níveis da CD73 (ecto-5-nucleotidase) estão aumentados significativamente nos rins de ratos infundidos com agiotensina II e induzem a expressão dos receptores A2B. Assim, é fortemente sugestivo que um aumento na sinalização mediada pelos receptores A2B renais contribua para a gênese da hipertensão induzida por angiotensina II (Zhang *et al.*, 2013). Em mulheres grávidas hipertensas ou com pré-eclâmpsia, os níveis da adenosina deaminase (ADA) estavam elevados em relação ao grupo controle (Oladipo; Afolabi; Okorodudu, 2009). Ohta *et al.* (2013) mostraram que a adenosina gerada pela CD73 age como fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), o que leva a uma vasodilatação coronária. Desse modo, a CD73 pode ser considerada uma EDHF sintase em coronárias de humanos e de ratos.

Compostos naturais

Alguns compostos naturais também têm demonstrado potencial para reduzir a pressão arterial através da sinalização purinérgica. Nesse sentido, compostos fenólicos contidos no vinho tinto demonstraram um poder anti-hipertensivo ao aumentar a atividade dos receptores P1 e reduzir a dos receptores P2 (Musial *et al.*, 2015). O gengibre (Zingiber officinale) e o açafrão (Curcuma longa) também tiveram uma ação anti-hipertensiva através de uma redução das atividades enzimáticas da NTPdase e da ADA (Akinyemi *et al.*, 2016).

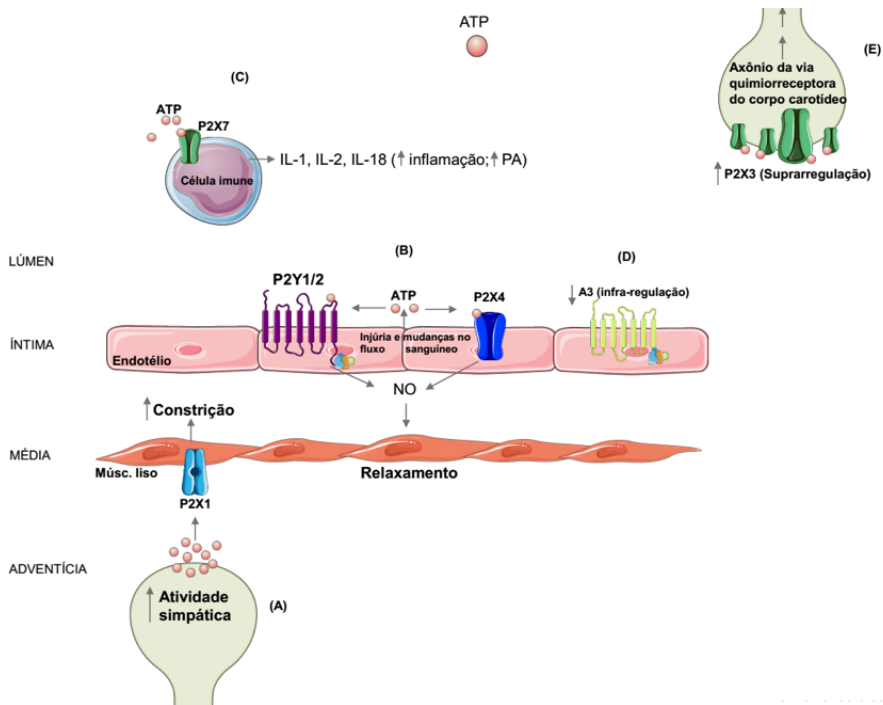
CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ATP liberado dos nervos simpáticos, como cotransmissor junto à noradrenalina, ativa os receptores P2X1 e promove constrição vascular de músculo liso. Quando há uma injúria, ATP liberado das células endoteliais atua nos receptores P2Y1, P2Y2 e P2X4 dessas células, as quais liberam NO, resultando em vasodilatação e queda da pressão arterial.

A hipóxia no tronco cerebral provoca liberação de ATP, o que promove um impulso simpático central, culminando no aumento da pressão arterial sistêmica. Um bloqueio dos receptores P2X3 causa inibição da atividade nervosa simpática através da sensibilidade reflexa aumentada dos quimioreceptores periféricos envolvendo o corpo carotídeo.

O receptor P2X7 está relacionado com a hipertensão através de uma resposta inflamatória elevada, e seu antagonimso reduziu a pressão sanguínea em modelos pré-clínicos. O balanço das enzimas ectonucleotidases está alterado na HTN.

Desse modo, a compreensão da sinalização purinérgica tem sido alvo de exploração em estudos pré-clínicos, uma vez que é bem estabelecido que a sua modulação pode contribuir para a gênese da HTN. Agonistas e antagonistas seletivos dos receptores purinérgicos, bem como inibidores das nucleotidases são alvos promissores para o controle e tratamento da hipertensão. Os principais mecanismos purinérgicos relacionados à hipertensão e ao controle do tônus vascular podem ser vistos na figura a seguir.

Figura 1: Principais mecanismos purinérgicos relacionados à HTN e à regulação do tônus vascular

Fonte: autores (2019).

A. Na HTN, há um aumento da atividade simpática que inerva os vasos sanguíneos. Desse modo, o ATP liberado dos nervos simpáticos ativa os receptores P2X1 e promove constrição vascular de músculo liso;
B. Sob injúria vascular e/ou mudanças no fluxo sanguíneo, o ATP é liberado das células endoteliais e, como um mecanismo compensatório, atua nos receptores P2Y1, P2Y2 e P2X4 dessas células, liberando NO, o que resulta em vasodilatação e queda da pressão arterial. De fato, agonistas desses receptores reduziram a pressão arterial em modelos pré-clínicos com HTN;
C. Em modelos com HTN, uma estimulação doreceptor P2X7 gera uma ação pró-inflmatória, levando à liberaçãode IL-1 beta, IL-18 dos macrófagos e IL-2 das células T, aumentando a PA;

D. Uma ativação dos receptores A3 promove vasodilatação e, em coronárias de ratos hipertensos, há uma infrarregulação desses receptores, quando comparados a ratos normais;
E. Há uma suprarregulação dos receptores P2X3 nos neurônios quimiorreceptores de modelos pré-clínicos hipertensos.

Nesse sentido, antagonistas dos receptores P2X3 têm demonstrado um efeito de inibição da atividade nervosa simpática através da sensibilidade reflexa aumentada dos quimiorreceptores periféricos envolvendo o corpo carotídeo.

REFERÊNCIAS

AKINYEMI, A, *et al.* Effect of Ginger and Turmeric Rhizomes on Inflammatory Cytokines Levels and Enzyme Activities of Cholinergic and Purinergic Systems in Hypertensive Rats. Planta Medica, [s.l.], v. 82, n. 07, p. 612-620, 22 mar. 2016. Georg Thieme Verlag KG. http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-102062.

BALOGH, J. *et al.* Phospholipase C and cAMP-dependent positive inotropic effects of ATP in mouse cardiomyocytes via P2Y-like receptors. Journal Of Molecular And Cellular Cardiology, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 223-230, ago. 2005. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.03.007.

BODIN, P.; BURNSTOCK, G. Evidence That Release of Adenosine Triphosphate From Endothelial Cells During Increased Shear Stress Is Vesicular. Journal Of Cardiovascular Pharmacology, Philadelphia, p. 902-908, 25 jun. 2001.

BRAGA, V. A. *et al.* Involvement ofl-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. The Journal Of Physiology, [s.l.], v. 581, n. 3, p. 1129-1145, 6 jun. 2007. Wiley. http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2007.129031.

BURNSTOCK, G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling. Purinergic Signalling, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 411-434, 11 ago. 2015. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/s11302-015-9462-7.

BURNSTOCK, G. Control of vascular tone by purines and pyrimidines. British Journal Of Pharmacology, [s.l.], v. 161, n. 3, p. 527-529, 3 set. 2010. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00937.x.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. International Review Of Cytology, [s.l.], p. 31-304, 2004. Elsevier. http://dx.doi.org/10.1016/s0074-7696(04)40002-3.

BURNSTOCK, G. Purinergic regulation of vascular tone and remodelling. Autonomic And Autacoid Pharmacology, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 63-72, jul. 2009. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-8673.2009.00435.x.

BURNSTOCK, G. The Concept of Cotransmission: Focus on ATP as a Cotransmitter and its Significance in Health and Disease. European Review, [s.l.], v. 22, n. 01, p. 1-17, fev. 2014. Cambridge University Press (CUP). http://dx.doi.org/10.1017/s1062798713000586

BURNSTOCK, G.; PELLEG, A. Cardiac purinergic signalling in health and disease. Purinergic Signalling, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-46, 20 dez. 2014. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/s11302-014-9436-1.

BURNSTOCK, G.; RALEVIC, V.. Purinergic Signaling and Blood Vessels in Health and Disease. Pharmacological Reviews, [s.l.], v. 66, n. 1, p. 102-192, 11 dez. 2013. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). http://dx.doi.org/10.1124/pr.113.008029.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. Circulation Research, [s.l.], v. 120, n. 1, p. 207-228, 6 jan. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.116.309726.

CARDOSO, A. M. Efeitos do exercício físico sobre a atividade de enzimas do sistema purinérgico e colinérgico em sangue de ratos hipertensos. 2014. 138 f. Tese (Doutorado) – Curso de Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

CARDOSO, A. M. *et al.* Physical exercise prevents memory impairment in an animal model of hypertension through modulation of CD39 and CD73 activities and A2A receptor expression. Journal Of Hypertension, [s.l.], p.1-10, jul. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/hjh.0000000000001845.

CARDOSO, A. M. *et al.* Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from Nω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride induced hypertension rats. Journal Of Hypertension, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 763-772, abr. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/hjh.0000000000000468.

CHEN, Z. *et al.* The P2X7 purinergic receptor: An emerging therapeutic target in cardiovascular diseases. Clinica Chimica Acta, [s.l.], v. 479, p. 196-207, abr. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2018.01.032.

FRANCO, M. *et al.* Physiopathological implications of P2X1 and P2X7 receptors in regulation of glomerular hemodynamics in angiotensin II-induced hypertension. American Journal Of Physiology-renal Physiology, [s.l.], v. 313, n. 1, p. 9-19, jul. 2017. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00663.2016.

GOURINE, A. V.; WOOD, J. D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in autonomic control. Trends In Neurosciences, [s.l.], v. 32, n. 5, p. 241-248, maio 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2009.03.002.

HEADRICK, J. P. *et al.* Cardiovascular adenosine receptors: Expression, actions and interactions. Pharmacology & Therapeutics, [s.l.], v. 140, n. 1, p. 92-111, out. 2013. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.002.

HO, M.-F.; LOW, L. M.; ROSE'MEYER, R. B. Pharmacology of the Adenosine A3 Receptor in the Vasculature and Essential Hypertension. Plos One, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 1-15, 23 fev. 2016. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150021.

HU, B. *et al.* P2X4Receptor Is a Glycosylated Cardiac Receptor Mediating a Positive Inotropic Response to ATP. Journal Of Biological Chemistry, [s.l.], v. 277, n. 18, p.15752-15757, 25 fev. 2002. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m112097200.

HUNG, Y.-W. *et al.* P2 purinergic receptor activation of neuronal nitric oxide synthase and guanylyl cyclase in the dorsal facial area of the medulla increases blood flow in the common carotid arteries

of cats. Neuroscience, [s.l.], v. 286, p. 231-241, fev. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.043.

JI, Xu *et al.* P2X7 receptor antagonism attenuates the hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. Hypertension Research, [s.l.], v. 35, n. 2, p.173-179, 15 set. 2011. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1038/hr.2011.153.

KOEPPEN, M.; ECKLE, T.; ELTZSCHIG, H. K. Selective Deletion of the A1 Adenosine Receptor Abolishes Heart-Rate Slowing Effects of Intravascular Adenosine In Vivo. Plos One, [s.l.], v. 4, n. 8, p. 1-9, 26 ago. 2009. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006784.

LEI-MING, R. *et al.* Electrophysiologic effects of adenosine triphosphate on rabbit sinoatrial node pacemaker cells via P1 receptors. Acta Pharmacologica Sinica, Shijiazhuang, p. 943-947, set. 2003.

MANFREDI, J. P.; HOLMES, W. Purine Salvage Pathways in Myocardium. Annual Review Of Physiology, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 691-705, out. 1985. Annual Reviews. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.47.030185.003355.

MARINA, N. *et al.* Brainstem Hypoxia Contributes to the Development of Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat. Hypertension, [s.l.], v. 65, n. 4, p. 775-783, abr. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.114.04683.

MENZIES, R. I. *et al.* Inhibition of the purinergic P2X7 receptor improves renal perfusion in angiotensin-II-infused rats. Kidney International, [s.l.], v. 88, n. 5, p.1079-1087, nov. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1038/ki.2015.182.

MONAHAN, T. S. *et al.* Adenosine A2a-receptor activation increases contractility in isolated perfused hearts. American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology, [s.l.], v. 279, n. 4, p. 1472-1481, out. 2000. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.4.h1472.

MUSIAL, D. C. *et al.* Chronic treatment with red wine modulates the purinergic neurotransmission and decreases blood pressure in hypertensive SHR and diabetic-STZ rats. International Journal Of Food Sciences And Nutrition, [s.l.], v. 66, n. 5, p. 579-586, 19 jun. 2015. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2015.1056110.

MUSTAFA, S. J. *et al.* Adenosine Receptors and the Heart: Role in Regulation of Coronary Blood Flow and Cardiac Electrophysiology. Adenosine Receptors In Health And Disease, [s.l.], p. 161-188, 2009. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-89615-9_6.

NAKAYAMA, Y. *et al.* Possible involvement of ATP-purinoceptor signalling in the intercellular synchronization of intracellular Ca2+ oscillation in cultured cardiac myocytes. Biosystems, [s.l.], v. 90, n. 1, p. 179-187, jul. 2007. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2006.08.002.

OLADIPO, O. O.; AFOLABI, B. B.; OKORODUDU, A. O. (2009). Adenosine Deaminase Activity in Subjects with Normal Pregnancy, Pregnancy Induced Hypertension and Pre-eclampsia. West

African journal of medicine. 28. 161-4. 10.4314/wajm.v28i3.48441.

OHTA, M. *et al.* Ecto-5'-Nucleotidase, CD73, Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Synthase. Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 629-636, mar. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.112.300600.

OKETANI, N. *et al.* Regulation of KATP channels by P2Ypurinoceptors coupled to PIP2 metabolism in guinea pig ventricular cells. American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology, [s.l.], v. 282, n. 2, p. 757-765, fev. 2002. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00246.2001.

OPARIL, S. *et al.* Hypertension. Nature Reviews Disease Primers, [s.l.], v. 4, p.1-21, 22 mar. 2018. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.14.

PELLEG, A. *et al.* Differential sensitivity of cardiac pacemakers to exogenous adenosine in vivo. American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology, [s.l.], v. 258, n. 6, p.1815-1822, jun. 1990. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1990.258.6.h1815.

PELLEG, A. Cardiac Electrophysiology and Pharmacology of Adenosine and ATP: Modulation by the Autonomic Nervous System. The Journal Of Clinical Pharmacology, [s.l.], v. 27, n. 5, p. 366-372, 6 maio 1987. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/j.1552-4604.1987.tb03032.x.

PIJACKA, W. *et al.* Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. Nature Medicine, [s.l.], v. 22, n. 10, p.1151-1159, 5 set. 2016. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1038/nm.4173.

PUSTOVIT, K. B.; KUZMIN, V. S.; ABRAMOCHKIN, Denis V.. Diadenosine tetra- and pentaphosphates affect contractility and bioelectrical activity in the rat heart via P2 purinergic receptors. Naunyn-schmiedeberg's Archives Of Pharmacology, [s.l.], v. 389, n. 3, p. 303-313, 17 dez. 2015. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/s00210-015-1199-x.

REHO, J. J. *et al.* Unique gene program of rat small resistance mesenteric arteries as revealed by deep RNA sequencing. Physiological Reports, [s.l.], v. 3, n. 7, p.1-16, jul. 2015. Wiley. http://dx.doi.org/10.14814/phy2.12450.

RIEG, J. A. D. *et al.* P2Y2receptor activation decreases blood pressure via intermediate conductance potassium channels and connexin 37. Acta Physiologica, [s.l.], v. 213, n. 3, p. 628-641, 8 jan. 2015. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/apha.12446.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, Jean; ZIMMERMANN, Herbert. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signalling, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 409-430, 30 maio 2006. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5.

RODRIGUES, J. Q. D. *et al.* Differential regulation of atrial contraction by P1 and P2 purinoceptors in normotensive and spontaneously hypertensive rats. Springer Nature, [s.l.], v. 37, n. 3, p. 210-219, 28 nov. 2013.

RUBINO, A. Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) neural control of the atrial myocardium. General Pharmacology: The Vascular System, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 539-545, maio 1993. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/0306-3623(93)90210-o.

SINGH, S.; SHANKAR, R.; SINGH, G. P. Prevalence and Associated Risk Factors of Hypertension: A Cross-Sectional Study in Urban Varanasi. International Journal Of Hypertension, [s.l.], v. 2017, p.1-10, 2017. Hindawi Limited. http://dx.doi.org/10.1155/2017/5491838.

SZENTMIKLÓSI, A. J. *et al.* Effect of adenosine on sinoatrial and ventricular automaticity of the guinea pig. Naunyn-schmiedeberg's Archives Of Pharmacology, [s.l.], v. 311, n. 2, p.147-149, mar. 1980. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/bf00510253.

VIRGILIO, F. di. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. Cancer Research, [s.l.], v. 72, n. 21, p. 5441-5447, 22 out. 2012. American Association for Cancer Research (AACR). http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-1600.

VONEND, O. *et al.* Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X7 receptor in diabetic and hypertensive rat models. Kidney International, [s.l.], v. 66, n. 1, p. 157-166, jul. 2004. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00717.x.

WANG, S. *et al.* P2Y2 and Gq/G11 control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction. Journal Of Clinical Investigation, [s.l.], v. 125, n. 8, p. 3077-3086, 13 jul. 2015. American Society for Clinical Investigation. http://dx.doi.org/10.1172/jci81067.

WEBER, M. A. *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypertension in the Community. The Journal Of Clinical Hypertension, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 14-26, 17 dez. 2013. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/jch.12237.

WHELTON, P. K. *et al.* 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. Journal Of The American College Of Cardiology, [s.l.], v. 71, n. 19, p.127-248, maio 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.006.

WU, Y. *et al.* Association between carotid atherosclerosis and different subtypes of hypertension in adult populations: A multiethnic study in Xinjiang, China. Plos One, [s.l.], v. 12, n. 2,15 fev. 2017. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0171791. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0171791. Acesso em: 17 out. 2018.

YANG, J.-N.; CHEN, J.-F.; FREDHOLM, B. B. Physiological roles of A1 and A2A adenosine receptors in regulating heart rate, body temperature, and locomotion as revealed using knockout mice and caffeine. American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology, [s.l.], v. 296, n. 4, p. 1141-1149, abr. 2009. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00754.2008.

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. Critical

Reviews In Biochemistry And Molecular Biology, [s.l.], v. 49, n. 6, p. 473-497, nov. 2014. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.3109/10409238.2014.953627.

ZHANG, W. *et al.* Elevated Ecto-5'-nucleotidase-Mediated Increased Renal Adenosine Signaling Via A2B Adenosine Receptor Contributes to Chronic Hypertension. Circulation Research, [s.l.], v. 112, n. 11, p. 1466-1478, 24 maio 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.111.300166.

ZHOU, Z. *et al.* Impaired Aortic Contractility to Uridine Adenosine Tetraphosphate in Angiotensin II-Induced Hypertensive Mice: Receptor Desensitization?. American Journal Of Hypertension, [s.l.], p. 304-312, 29 dez. 2016. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/ajh/hpw163.

DISTÚRBIOS TIREOIDIANOS: ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Jucimara Baldissarelli

INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos (HTs), além de afetar a síntese e a degradação de outros hormônios, apresentam funções fisiológicas variadas e modulam rotas metabólicas importantes (Iwen *et al.*, 2013). Estão relacionados a muitas doenças envolvendo o Sistema Nervoso Central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP), e sua ausência pode levar a diminuição da concentração e memória (Djurovic *et al.*, 2018) ou depressão (Loh *et al.*, 2019), além de causar alterações como hipertensão e hipercolesterolemia (Santi, *et al.*, 2010). A produção ou distribuição alterada dos HTs podem levar, assim, a significantes distúrbios endócrinos, tais como o hipotireoidismo e o hipertireoidismo (Silva *et al.*, 2011; Vanderpump, 2011).

O hipotireoidismo resulta da produção ou secreção diminuída dos hormônios tireoidianos e causa manifestações clínicas características de insuficiência hormonal (Camacho, 2011). Já o hipertireoidismo se refere ao aumento da produção ou secreção de hormônios devido à hiperfunção da tireoide (Silva *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013). O tratamento para reestabelecer valores hormonais normais é imprescindível aos indivíduos acometidos, sendo necessário monitoramento frequente dos níveis dos hormônios no organismo. Porém, uma variação entre os pacientes pode levar a uma resposta inadequada ao tratamento (Tyerney *et al.*, 2009).

Dentre os sistemas envolvidos nos sintomas e características dos distúrbios tireoidianos, o sistema purinérgico destaca-se por seu papel em modular uma variedade de processos biológicos (Schetinger *et al.*, 2007), com grande importância nos mecanismos de resposta de diversas doenças. O sistema vem sendo estudado nas alterações dos SNC (Vasilopoulou *et al.*, 2016) e SNP que ocorrem nos distúrbios da tireoide (Bruno *et al.* 2011; Baldissarelli *et al.*, 2016; 2017). As atividades das enzimas que degradam os nucleotídeos de purinas estão alteradas em doenças como diabetes *mellitus* (Schmatz *et al.*, 2009; Stefanello *et al.*, 2016), hipertensão (Cardoso *et al.*, 2012), câncer (Zanini *et al.*, 2012) e também no hipotireoidismo (Baldissarelli *et al.*, 2017), sendo de grande importância no estudo das alterações apresentadas pelos pacientes ou em modelos experimentais de doenças tireoidianas.

Desse modo, estudos que relacionam o sistema purinérgico com o hipotireoidismo ou hipertireoidismo apresentam resultados interessantes. Neste capítulo, serão abordados os principais dados publicados na literatura sobre o tema. Assim, enfatizamos as possíveis alterações causadas por essas desordens na atividade e expressão enzimática das enzimas purinérgicas, além das variações nos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina e sua provável relação com os sintomas observados.

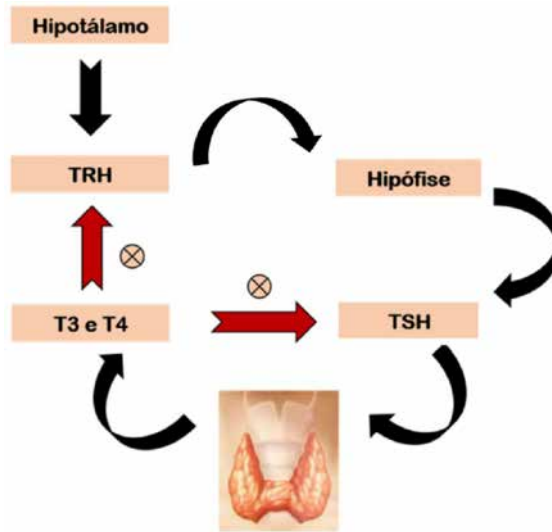
Tireoide

A tireoide é uma glândula rica em vasos sanguíneos, situada na região inferior do pescoço, com estrutura composta por dois tipos de células primárias: células parafoliculares que secretam calcitonina, envolvida no controle da homeostase do cálcio; e células foliculares ou tireócitos, responsáveis pela tireoglobulina e síntese de HTs. Esses hormônios são armazenados e liberados pela glândula e atuam em uma grande variedade de células, influenciando no controle geral do metabolismo através da regulação das funções dessas células e órgãos. Assim, alterações na sua produção ou liberação podem estar envolvidas em desordens metabólicas (Hall, 2017).

A tireoglobulina é uma glicoproteína iodada de alto peso molecular presente nos folículos da tireoide que funciona como um suporte para a produção dos HTs e local para armazenamento destes e seus precursores (Stathatos,

2012). A biossíntese requer a presença do iodeto proveniente da dieta e, assim, a quantidade diária de iodo recomendada para adultos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de 150 μg. A captação e concentração do iodeto na tireoide, assim como a síntese dos hormônios é estimulada pelo hormônio estimulante da tireoide (TSH) e essa regulação ocorre em um sistema de retroalimentação negativa que envolve o hipotálamo, a hipófise e a tireoide, como ilustra a Figura 1 (Nogueira, *et al.*, 2011; Stathatos, 2012).

Neurônios secretores do hormônio liberador de tireotrofina (TRH), localizados predominantemente no hipotálamo, liberam o TRH no sistema portal hipofisário, o que estimula a síntese e a secreção de TSH na hipófise. Na tireoide, o TSH estimula a biossíntese dos hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). O TSH atua primariamente via receptores acoplados à via de sinalização da adenilil ciclase e cruzado com a via de sinalização da fosfolipase C. Os próprios hormônios da tireoide têm um controle de *feedback* negativo sobre o hipotálamo e a pituitária anterior, controlando, assim, a liberação de TRH e TSH (Nogueira, 2011; Costa; Sousa *et al.*, 2012). Quando os níveis de T4 estão altos diminuiu a secreção do TSH pela hipófise e quando estão baixos aumentam os níveis de TSH, o qual estimula a síntese de AMPc que atua causando múltiplas fosforilações na célula, resultando em aumento na captação de iodo e secreção de T3 e T4 (Rhoades; Tanner, 2005). A função adequada deste eixo e seus mecanismos de *feedback* é responsável pelo desenvolvimento normal do organismo, diferenciação, crescimento, termogênese e reprodução (White, 2010).

Figura 1: Mecanismo de regulação dos hormônios da tireoide

Fonte: Baldissarelli, J. (2017).

Os hormônios T3 e T4 são secretados em quantidades diferentes, sendo tiroxina (T4) a maior parte, enquanto aproximadamente 10% são triiodotironina (T3), a qual é cerca de três a quatro vezes mais potente que a T4. Apesar de T3 ser menos liberada e permanecer durante tempo mais curto na circulação, grande porção de T4 é convertida em T3 nos tecidos periféricos. Isso possibilita sua ação, através da ligação a receptores específicos de alta afinidade chamados de receptores de tireoide, pertencentes à superfamília dos receptores nucleares, e medeiam múltiplos efeitos no fenótipo, proliferação e expressão gênica (Burch, 2009; Hall, 2017). As proteínas plasmáticas ligam-se aos hormônios para realizar seu transporte na circulação, e a forma ligada é considerada um reservatório hormonal, já que apenas a forma livre é responsável pelos efeitos biológicos. Assim, quando necessário, a forma ligada provê a fração livre à medida que ela é consumida pelos tecidos (Bianco *et al.*, 2002).

É indiscutível a importância dos HTs no organismo, pois estão envolvidos desde o crescimento e desenvolvimento (White, 2010) até efeitos em vias cruciais para a manutenção da vida e no correto funcionamento do SNC e suas

funções (Iwen *et al.*, 2013; Djurovic *et al.*, 2018). Além disso, possuem papel relevante na regulação do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos e outras vias endócrinas (Abbracchio *et al.*, 2009). Devido a serem os maiores reguladores dos processos metabólicos oxidativos, o metabolismo oxidativo total em repouso, medido pelo consumo de oxigênio, é altamente sensível ao status dos HTs (Hampl *et al.*, 2006). Dessa forma não é de surpreender que mudanças nas concentrações sanguíneas desses hormônios causem sérios problemas ao organismo. O hipotireoidismo e o hipertireoidismo são exemplos importantes de distúrbios endócrinos causados pelas alterações na produção ou distribuição dos hormônios tireoidianos (Brenta *et al.*, 2013).

Hipotireoidismo

O hipotireoidismo é, dentre as possíveis desordens tireoidianas, a mais comum. As mulheres são as mais afetadas, uma vez que são acometidas aproximadamente oito vezes mais do que os homens (Endocrine Society, 2017). A prevalência geral estimada da população é entre 1 a 2% em áreas com suprimento suficiente de iodo e 4 a 5% em áreas com deficiência de iodo (Vanderpump, 2011). Assim, a falta de iodo, a doença autoimune da tireoide, a redução do tecido tireoidiano por iodo radioativo, o uso de alguns medicamentos que inibem a síntese dos hormônios tireoidianos ou a tireoidectomia são alguns dos fatores que levam ao desenvolvimento do hipotireoidismo (Brenta, 2013).

Existem diferentes classificações para o hipotireoidismo: primário, com origem na tireoide é o mais observado, acompanhado de níveis séricos elevados de TSH; e secundário, com origem na hipófise e níveis séricos de TSH normais ou baixos (Gusso; Lopes, 2012). As manifestações do hipotireoidismo incluem fadiga, letargia, intolerância ao frio, dores de cabeça e fraqueza. À medida que a doença evolui, os sintomas são mais evidentes, como ganho de peso, pele seca, unhas fracas e quebradiças, rouquidão, irregularidades menstruais, constipação, bradicardia, capacidade locomotora retardada, além de sonolência, lentidão no processamento de informação, reflexos lentos, problemas de memória, depressão, demência ou mudanças de personalidade (White, 2010; Camacho, 2011).

Além disso, sabe-se que os hormônios tireoidianos podem atuar no sistema vascular e variação nos seus níveis podem causar alterações associadas à

maior incidência de doenças cardiovasculares, como aterosclerose e insuficiência cardíaca. No hipotireoidismo pode ocorrer hipertensão, hipercolesterolemia, aumento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de apolipoproteína (Klein; Danzi, 2007; Santi *et al.*, 2010), fatores que favorecem um acentuado estado pró-trombótico.

O tratamento do hipotireoidismo é, comumente, baseado na reposição hormonal, através de administração de levotiroxina (T4), a qual é convertida em triiodotironina (T3), por ação enzimática, no organismo. Assim, a terapia farmacológica é geralmente realizada durante toda a vida dos pacientes, sendo necessários alguns cuidados, como ajuste de dose e acompanhamento clínico e laboratorial periodicamente (Brenta *et al.*, 2013).

Hipertireoidismo

O hipertireoidismo apresenta prevalência menor em comparação ao hipotireoidismo. Mas também é alterado por fatores como a idade e o sexo, afetando aproximadamente 2% das mulheres e 0,2% dos homens em nível mundial (Endocrine Society, 2017). Ao contrário do hipotireoidismo, o hipertireoidismo consiste no aumento da produção de hormônios pela tireoide (Wu *et al.*, 2013). A doença de Graves é responsável por cerca de 60% a 90% dos casos de hipertireoidismo. Essa doença é autoimune e advém da produção de anticorpos que estimulam os receptores de TSH, levando a um aumento de volume e da função da tireoide, que secreta hormônios excessivamente (Farwell; Braverman, 2006).

As manifestações mais comuns do hipertireoidismo são as relacionadas a um estado hipermetabólico e de diminuição da resistência vascular periférica (Tierney *et al.*, 2009), como perda de peso, sudorese excessiva, alterações oculares, irritabilidade, ansiedade, aumento de apetite, pele quente e úmida, taquicardia, tremores, distúrbios do sono, paranoia, depressão e, nas situações mais graves, convulsões. (Farwell; Braverman, 2006; Boelaert *et al.*, 2010). O papel do hipertireoidismo nas doenças cardiovasculares não está completamente elucidado, mas um estudo clínico demonstrou relação entre hipertireoidismo e aumento do risco de eventos trombóticos (Squizzato *et al.*, 2007). Contudo, a maior parte das pesquisas sugere associação do hipotireoidismo com a aterogênese e alterações cardiovasculares (Ichiki, 2015; Altay *et al.*, 2017).

Pacientes com hipertireoidismo são tratados com medicamentos antitireoidianos, como o metimazol, ou através de cirurgia ou radioisótopos. Cada uma das terapias tem suas vantagens e desvantagens e, frequentemente, uma combinação é realizada, em busca da resposta terapêutica ideal. Além disso, outros medicamentos específicos, que não os de base, podem ser indicados para tratar sintomas mais graves relacionados à desordem, tais como ansiedade e taquicardia (Farwell; Braverman, 2006; Maia *et al.*, 2013).

Hipotireoidismo, hipertireoidismo e sinalização purinérgica no SNC

O sistema purinérgico apresenta os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, como ATP, ADP, AMP e adenosina (Ado) como moléculas de sinalização extracelular capazes de modular uma variedade de processos biológicos, incluindo neurotransmissão, fluxo sanguíneo, secreção, inflamação e tromborregulação (Abbracchio *et al.*, 2009; Fuentes; Palomo, 2015). Essas moléculas são secretadas nos fluidos extracelulares e têm sua concentração influenciada pela lise celular, permeabilidade da membrana plasmática, exocitose das vesículas secretoras e atividade das enzimas que realizam sua hidrólise (Malmsjo *et al.*, 2000), exercendo seu papel, em vários tecidos, através dos receptores purinérgicos, localizados na superfície celular (Burnstock, 2004; Abbracchio *et al.*, 2009).

O ATP é uma molécula de sinalização de grande importância no SNC, podendo ser liberado de praticamente todas as células, em condições fisiológicas e patológicas, e suas concentrações extracelulares podem aumentar significativamente. Além de ser liberado por exocitose como um cotransmissor juntamente com outros neurotransmissores, como a acetilcolina e o glutamato, pode ser liberado através de panexinas ou conexinas que funcionam como condutores entre o citoplasma e o espaço extracelular (Junger, 2011; Eltzschig *et al.*, 2012; Idzko *et al.*, 2014). A glândula tireoide é inervada por aferentes simpáticos, parassimpáticos e sensoriais; portanto, o ATP poderia ser liberado a partir de terminações nervosas, de células endoteliais capilares ou dos próprios tireócitos (Kochukov *et al.*, 2005).

O ATP liberado atua como um ligante extracelular para duas famílias de receptores purinérgicos, P2X e P2Y (Coddou *et al.*, 2011), ambos expressos em uma variedade de células endócrinas (Stojilkovic *et al.*, 2013; Burnstock, 2014).

A liberação de nucleotídeos ocorre no meio extracelular por células sanguíneas e vasculares, como eritrócitos, plaquetas e células endoteliais, podendo também ocorrer em locais de dano celular ou inflamação e na presença de estresse oxidativo (Burnstock, 2015).

É bastante conhecido que as enzimas do sistema purinérgico, NTPDases (Nucleotídeo trifosfato difosfoidrolase, NPPs (Nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases), 5'-NT (5'-nucleotidase) e ADA (adenosina desaminase) possuem um importante papel na neurotransmissão, neuromodulação, regulação da formação de trombos e nas respostas inflamatórias (Zanini *et al.*, 2012; Stefanello *et al.*, 2016). Já na glândula tireoide, pouco é conhecido sobre as NTPDases, mas um membro da família das NPP foi implicado no desenvolvimento do carcinoma da tireoide (Seifert *et al.*, 2008). Além disso, as células papilares de carcinoma da tireoide expressam forte imunorreatividade e atividade enzimática da 5'-NT (Kondo *et al.*, 2006). A análise imuno-histoquímica da glândula tireoide de ratos adultos sugeriu a expressão dos receptores P2X3, P2X4 e P2X5 em células foliculares e endoteliais (Glass *et al.*, 2001). Já os tireócitos humanos expressam diversos subtipos dos receptores P2X (Caraccio *et al.*, 2005), sendo que o P2X7 está presente no carcinoma papilífero da tireoide (Solini *et al.*, 2008) e é correlacionado com fatores de mau prognóstico (Kwon *et al.*, 2014) e diversos subtipos de receptores P2Y, sendo que a administração de ATP induz a produção e liberação de interleucina-6 a partir dessas células, presumivelmente por meio da ativação de um desses receptores (Caraccio *et al.*, 2005).

Apesar de serem produzidos e liberados pela tireoide, os hormônios tireoidianos, como já observado, possuem papel fundamental na neurotransmissão por promoverem um aumento na síntese e sensibilidade dos receptores centrais de catecolaminas e também modular o transporte de Ado e seus receptores (Carageorgiou *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2013). Assim, estudos vêm sendo realizados para elucidar melhor o papel da sinalização purinérgica nessas alterações. A atividade da enzima NTPDase em sinaptossoma de córtex cerebral não demonstrou alteração em animais com hipotireoidismo, enquanto a atividade da 5'-NT aumentou (Bruno *et al.*, 2005; Baldissarelli *et al.*, 2017), o que poderia levar a maiores níveis de Ado desde os estágios iniciais da doença, sendo fundamental na regulação da neuromodulação e na liberação de vários neurotransmissores (Cunha, 2005).

Bruno *et al.* (2005a) também demonstraram que o hipotireoidismo aumentou a hidrólise do AMP a Ado em sinaptossomas de hipocampo de ratos, enquanto o hipertireoidismo diminuiu a hidrólise de ATP em ambos, sinaptossomas de hipocampo e córtex cerebral (Bruno *et al.*, 2003). O estudo de Baldissarelli *et al.* (2017) avaliou a atividade da ADA em sinaptossoma de córtex cerebral e demonstrou não haver diferença em animais com hipotireoidismo, podendo ocorrer um acúmulo de Ado. Esses estudos levaram à alusão de que o aumento da disponibilidade de ATP como neurotransmissor excitatório e diminuição potencial de Ad como uma molécula inibidora podem estar associados a alguns sintomas de hipertireoidismo (Bruno *et al.*, 2003). Já os efeitos inibitórios observados no hipotireoidismo poderiam ser justificados pelo provável aumento nos níveis de Ado nos sinaptossomas cerebrais dos ratos hipotireoideos (Bruno *et al.*, 2005a; Baldissarelli *et al.*, 2017).

Além disso, outros estudos em fatias hipocampais e corticais de ratos com hipotireoidismo e hipertireoidismo também observaram aumento na hidrólise de ATP, ADP e AMP, o qual foi revertido com administração de T4. Esse estudo também avaliou a expressão da NTPDase1 e da 5'-NT que aumentaram no hipotireoidismo, enquanto o hipertireoidismo diminuiu a expressão da 5'-NT no hipocampo de ratos adultos (Bruno *et al.*, 2005b). Dessa forma, o equilíbrio de nucleotídeos extracelulares e Ado é afetado por essas desordens, possivelmente interferindo na liberação de neurotransmissores, desenvolvimento, e outros processos fisiológicos.

Devido ao papel já demonstrado do ATP na indução de diferenciação, proliferação e astrogliose reativa no tecido lesionado, em astrócitos cultivados (Neary *et al.*, 1999), a relação entre as os HTs e as ectonucleotidases também foi investigada em cultura celular de cérebro de ratos submetidos a hipotireoidismo neonatal. Esse estudo demonstrou alteração na hidrólise dos nucleotídeos nos astrócitos cerebelares e hipocampais, o que causaria desse-quilíbrio nos níveis de ATP e Ado nos astrócitos durante o desenvolvimento e pode contribuir para alguns dos efeitos descritos no hipotireoidismo neonatal (Braganhol *et al.*, 2006).

Muitos estudos têm avaliado a ação protetora de compostos antioxidantes nas doenças endócrinas e metabólicas. Assim, ratos com hipotireoidismo tratados com quercetina apresentaram uma diminuição na atividade, tanto da NTPDase quanto da 5'-NT, em sinaptossomas de córtex cerebral. Da mesma forma, a atividade da ADA também diminuiu o que poderia contribuir para

níveis moderadamente aumentados de Ado (Baldissarelli *et al.*, 2017). Devido à ação neuroprotetora desse nucleosídeo, esse pode ser um dos mecanismos dos efeitos benéficos exercidos pela quercetina no SNC (Dajas, 2012; Dong *et al.*, 2014).

Hipotireoidismo, hipertireoidismo e sinalização purinérgica no sistema vascular

Da mesma forma que causam alterações na sinalização purinérgica no SNC, os hormônios tireoidianos estão amplamente envolvidos em alterações vasculares, e seus níveis alterados podem ser considerados fator de risco para diversas patologias, especialmente cardiovasculares. Diversos estudos já relacionaram os distúrbios da tireoide com alterações na hemostasia sanguínea, levando a eventos trombóticos ou tendências a sangramento (Erem *et al.*, 2003; Stuijver *et al.*, 2012; Ichiki, 2015; Baldissarelli *et al.*, 2016).

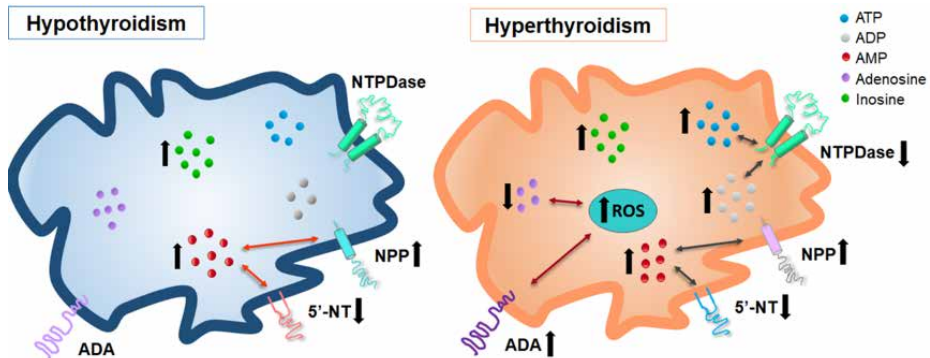
No sistema vascular a sinalização purinérgica tem o potencial de influenciar funções cardíacas, participar de respostas vasomotoras e controlar as funções plaquetárias e os processos inflamatórios (Burnstock; Ralevic, 2014). Nesse contexto, as plaquetas são células de grande importância, pois circulam em estreito contato com as células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos e aderem ao local lesionado sempre que o dano acontece (Salles *et al.*, 2008). A adesão plaquetária é mediada por receptores específicos, que respondem à ligação do agonista gerando uma propagação do fluxo de íons Ca+ para o interior da célula e estimulando a agregação plaquetária. A fase de secreção que acontece em seguida, leva à liberação de substâncias contidas nos grânulos densos (ADP, ATP, cálcio e serotonina), além de enzimas e fatores de coagulação presentes nos grânulos alfa (Birk *et al.*, 2002; Diamond *et al.*, 2013).

Assim, estudos demonstraram os efeitos do hipotireoidismo e hipertireoidismo sobre as atividades da ectonucleotidases em plaquetas de ratos, e os resultados mostraram uma diminuição nas atividades da NTPDase e 5'-NT no hipertireoidismo, o que poderia implicar um aumento nos níveis de nucleotídeos. Já os animais com hipotireoidismo apresentaram diminuição apenas na atividade da 5'-NT (Bruno *et al.*, 2005; Baldissarelli *et al.*, 2016; 2018). Bruno

et al. (2005) também administraram T4 aos animais com hipotireoidismo, o que reverteu a inibição da hidrólise do AMP observada. Assim, como esse é o tratamento comumente utilizado pelos pacientes, esse dado indica efeito benéfico da terapia de reposição hormonal no sistema purinérgico.

Além disso, Baldissarelli *et al.*, (2018) também realizaram a análise dos níveis dos nucleotídeos e nucleosídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), confirmando que os níveis de ATP, ADP e AMP estão aumentados no hipertireoidismo enquanto, no hipotireoidismo aumentam somente os níveis de AMP, possivelmente devido à baixa atividade da 5'-NT e à elevada atividade da NPP. Quanto à atividade elevada da NPP em ambas as desordens, pode-se inferir que o aumento da hidrólise de ATP gera mais AMP, uma molécula protetora que poderia ainda ser hidrolisada a Ado, a qual exerce efeitos vasodilatadores e inibidores da agregação plaquetária (Battisti *et al.*, 2013; Burnstock; Ralevic, 2014). Porém, a atividade reduzida da 5'- NT e a atividade aumentada da ADA podem ser responsáveis por diminuir os níveis de Ado e elevar as concentrações de inosina em ratos com hipertireoidismo. Esse aumento na atividade da ADA é desfavorável, pois causa maior desaminação da Ado, deixando o organismo mais suscetível a danos e agravos, devido à falta desse nucleosídeo.

Outro dado importante a ser destacado é a presença de estresse oxidativo nas doenças tireoidianas, o qual pode induzir disfunção endotelial e aumentar a reatividade plaquetária através de efeitos diretos sobre as plaquetas, tais como um aumento da peroxidação lipídica e depleção de sistemas de defesa antioxidantes (Santi *et al.*, 2014; Baldissarelli *et al.*, 2016). Em conjunto, esses mecanismos podem contribuir para o aumento do potencial trombótico evidenciado no hipotireoidismo (Grant, 2007). Além disso, Baldissarelli *et al.* (2018) sugerem que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) poderia ser um dos responsáveis pelos níveis de Ado diminuídos no hipertireoidismo. A deterioração oxidativa da membrana plaquetária causada pelas ERO poderia ser uma das causas dessa diminuição, ao contribuir para as alterações observadas na atividade das enzimas NTPDase, 5'-NT e NPP, uma vez que estas ectoenzimas estão presentes na membrana plaquetária e podem sofrer modificações em sua estrutura e consequentemente mudanças em suas atividades. Os efeitos dos distúrbios tireoidianos nas plaquetas estão resumidos na Figura 2.

Figura 2: Efeitos do hipotireoidismo e hipertireoidismo no sistema purinérgico em plaquetas

Fonte: Baldissarelli *et al.*, 2018.

Adicionalmente, em estudo realizado com pacientes com hipotireoidismo pós-tireoidectomia, os resultados mostraram um aumento nas atividades das enzimas do sistema purinérgico. Além disso, a expressão de NTPDase (CD39) foi maior nos pacientes, indicando também mudanças em nível molecular, levando a uma maior degradação de ATP e ADP. Esse aumento na hidrólise é importante, uma vez que ADP é responsável por muitos processos anormais, incluindo a agregação plaquetária. Ao contrário do verificado nos animais com hipotireoidismo, a atividade da 5'-NT também aumentou, porém, a expressão da enzima não se alterou nas plaquetas dos pacientes, sugerindo que a falta de hormônios tireoidianos não foi suficiente para causar alteração a nível molecular nessa enzima. Da mesma forma, o estudo demonstrou que a atividade da ADA estava aumentada nos pacientes com hipotireoidismo e em concordância, os níveis de Ado, verificados através de CLAE, diminuídos.

Na tentativa de buscar alternativas terapêuticas que pudessem auxiliar no controle dos sintomas e alterações clínicas e serem adjuvantes no tratamento dos distúrbios tireoidianos, estudos vêm avaliando o papel de compostos naturais administrados a animais com hipotireoidismo e hipertireoidismo (Carageorgiou, 2007; Baldissarelli *et al.*, 2016; 2017). Dessa forma, Baldissarelli *et al.*, (2016) demonstraram que a quercetina, quando administrada a animais com hipotireoidismo, possui efeitos benéficos ao inibir a atividade de NTPDase, 5'-NT e ADA em plaquetas, possivelmente devido à ação quelante desse

flavonoide. Assim, mais Ado estaria disponível no ambiente extracelular e seus efeitos seriam potencializados, o que pode ser relacionado à inibição da agregação plaquetária apresentada pelos animais com hipotireoidismo tratados com quercetina (Baldissarelli *et al.*, 2016).

Além da ação na reatividade plaquetária, os HTs também já foram relacionados a alterações nas células cardíacas, tendo sido demonstrado que T3 aumenta a hidrólise de ATP e ADP e a expressão da NTPDase 3 em culturas primárias de miócitos ventriculares de ratos. Os autores desse estudo sugerem que o aumento na hidrólise de ATP pode ser importante para a prevenção da contratilidade excessiva, já que o T3 promove um aumento na contratilidade, podendo levar à hipertrofia cardíaca (Barreto-Chaves *et al.*, 2006). Em adição, Cotomacci *et al.*, (2012) demonstraram que o hipotireoidismo aumenta a atividade da 5'-NT na fração solúvel de tecido cardíaco, aumentando a produção de Ado. Esse nucleosídeo contribui para o efeito cardioprotetor e manutenção da função cardíaca, já que diminui a demanda de O2 reduzindo a frequência cardíaca, condução atrioventricular e força de contração e causando vasodilatação coronária.

Hipotireoidismo, hipertireoidismo e sinalização purinérgica em outros sistemas

A Ado e o ATP podem atuar como neuromoduladores da dor na medula espinhal (Tsuda *et al.*, 1999; Ford, 2012), através de efeitos opostos, pronocicepção induzida pelo ATP, como observado em modelos de dor (Ding *et al.*, 2000) e antinocicepção promovida pela Ado em situações clínicas (Sawynok, 2016). Seguindo essa linha de raciocínio, Bruno *et al.* (2005b) investigaram a hidrólise de nucleotídeos purinérgicos em sinaptossomas da medula espinhal de ratos com hipotireoidismo e hipertireoidismo em diferentes idades e a relação com a resposta nociceptiva. No estudo, o hipotireoidismo provocou aumento na hidrólise de AMP em paralelo com uma resposta analgésica pronunciada, possivelmente devido ao aumento nos níveis de Ado. Da mesma forma, a diminuição da hidrólise do ATP pode explicar o aumento da resposta nociceptiva no hipertireoidismo, apoiando a provável relação entre ectonucleotidases e nocicepção em doenças da tireoide.

Um estudo utilizando um agonista do receptor A1 em ratos com hipertireoidismo demonstrou que o inibidor reverteu a hiperalgesia induzida pelo hipertireoidismo e diminuiu o comportamento exploratório, locomoção e ansiedade em ratos com hipertireoidismo. Além disso, diminuiu parâmetros oxidativos no hipocampo e no córtex cerebral desses animais, sugerindo que alguns dos efeitos do hipertireoidismo estão submetidos à regulação pelo receptor A1 de adenosina (Bruno *et al.*, 2005b), reforçando, portanto, o envolvimento do sistema adenosinérgico nesta patologia.

Em adição ao já mencionado papel dos HTs no SNC e periférico, a relação entre esses hormônios e o sistema purinérgico também foi demonstrada em testículos. A participação das células de Sertoli na secreção de produtos proteicos é considerada essencial para a manutenção da espermatogênese (Maran *et al.*, 1999). Sendo esse processo regulado a nível hormonal, alterações na atividade da tireoide estão frequentemente associadas a alterações na função reprodutiva masculina. Longcope *et al.* (1991) demonstraram que um atraso na maturação sexual e no desenvolvimento está associado a quadros de hipotireoidismo desenvolvido logo após o nascimento. Um estudo detectou a presença das enzimas NTPDase 1, 2, e 3 em culturas de células de Sertoli, as quais não foram alteradas no hipotireoidismo. Contudo, suas atividades diminuíram significativamente. Além disso, diversos estudos sugerem que os nucleotídeos de adenina podem modular respostas através dos purinoceptores presentes nestas células (Ko *et al.*, 1998; Burnstock, 2014b). Dessa forma, embora pouco se tenha estudado sobre os efeitos dos distúrbios tireoidianos nessas células, já se pode observar que os HTs modificam as atividades da NTPDase, provavelmente por mecanismos não genômicos e, consequentemente, pode influenciar a função reprodutiva durante o desenvolvimento (Zamoner *et al.*, 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Avaliados em conjunto, os estudos mencionados neste texto demonstram a forte relação entre os hormônios tireoidianos e a sinalização purinérgica em diferentes sistemas fisiológicos e patológicos. Salienta-se a associação entre alguns sintomas dos distúrbios tireoidianos, com as enzimas responsáveis pela

manutenção dos níveis de ATP, ADP, AMP e Ado, bem como os receptores para essas moléculas. Além disso, a literatura disponível sugere que o estresse oxidativo presente no hipotireoidismo e no hipertireoidismo se relaciona com alterações na atividade das ectonucleotidases e nos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos. A modulação de enzimas purinérgicas parece ser uma via que evita os efeitos indesejáveis da concentração elevada de nucleotídeos. Assim, os estudos mencionados podem ajudar a entender as alterações metabólicas que ocorrem nas desordens tireoidianas e prevenir episódios que possam representar riscos para a saúde dos pacientes.

REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO, M. P. *et al.* Purinergic signalling in the nervous system: an overview. Trends Neurosci, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009.

ALTAY, M. *et al.* Serum Total Sialic Acid Level is Elevated in Hypothyroid Patients as an Atherosclerotic Risk Factor. J. Clin. Lab. Anal, 2017.

BALDISSARELLI, J. *et al.* Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism. Biomed Pharmacother, v. 84, p. 1849-1857, 2016.

BALDISSARELLI, J., *et al.* Hypothyroidism enhanced ectonucleotidases and activities in rat synaptosomes can be prevented by the naturally occurring polyphenol quercetin. Cell Mol Neurobiol. v. 37, p. 53-63, 2017.

BALDISSARELLI, J. *et al.* Post-thyroidectomy hypothyroidism increases the expression and activity of ectonucleotidases in platelets: possible involvement of reactive oxygen species. Platelets, v. 1, p. 1-10, 2017.

BALDISSARELLI, J. *et al.* Hypothyroidism and hyperthyroidism change ectoenzymes activity in rat platelets. J Cel Biochemestry, v. 119, p. 6249-6257, 2018.

BIANCO, A. C. *et al.* Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. Endocr Rev, v. 23, n. 1, p. 38-89, 2002.

BOROWIEC, A. *et al.* Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. Acta Biochim Pol, v. 53, n. 2, p. 269-78, 2006.

BRENTA, G. *et al.* Em nome da Força Tarefa em Hipotireoidismo da Sociedade Latino-Americana de Tiroide (LATS). Diretrizes clínicas práticas para o manejo do hipotireoidismo. Arq Bras Endocrinol Metab, v. 57, n. 4, São Paulo, 2013.

BRUNO, A. N. *et al.* Hyperthyroidism modifies ecto-nucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex of rats in different phases of development. Int J Dev Neurosci, v. 21, n. 7, p. 401-408, 2003.

BRUNO, A. N. *et al.* 5'-nucleotidase activity is altered by hypo- and hyperthyroidism in platelets from adult rats. Platelets, v. 16, n. 1, p. 25-30, 2005.

BRUNO, A. N. *et al.* Hypothyroidism changes adenine nucleotide hydrolysis in synaptosomes from hippoCampus and cerebral cortex of rats in different phases of development. Int J Dev Neurosci, v. 23, n. 1, p. 37-44, 2005.

BRUNO, A. N. *et al.* Thyroid hormones alter the adenine nucleotide hydrolysis in adult rat blood serum. Biofactors, v. 37, n. 1, p. 40-5, 2011.

BOELAERT, K. *et al.* Older subjects with hyperthyroidism present with a paucity of symptoms and signs: a large cross-sectional study. J Clin Endocrinol Metab, v. 95, n. 6, p. 2715-26, 2010.

BURCH, W. M. Basic Information about thyroid gland. *In*: Burch, W. M. 100 Questions & Answers about Thyroid

Disorders. Jones & Bartlett Publishers, 2009.

BURNSTOCK, G. Cotransmission. Curr Opin Pharmacol, v. 4, n. 1, p. 47-52, 2004.

BURNSTOCK, G.; RALEVIC, V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. Pharmacol Rev, v. 66, n. 1, p. 102-92, 2014.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. Purinergic Signal, v. 10, n.1, p. 157-187, 2014.

BURNSTOCK, G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling. Purinergic Signal, v. 11, n. 4, p. 411-34, 2015.

CAMACHO, P. M. Thyroid Disorders. *In*: Camacho, P. M. Clin Endocr & Metab. London: Mason Publishing, 2011.

CARACCIO, N. *et al.* Extracellular adenosine 5'-triphosphate modulates interleukin-6 production by human thyrocytes through functional purinergic P2 receptors. Endocrinology, v. 146, p. 3172-3178, 2005.

CARAGEORGIOU, H. *et al.* Changes in acetylcholinesterase, Na+,K+-ATPase, and Mg2+- ATPase activities in the frontal cortex and the hippoCampus of hyper- and hypothyroid adult rats. Metabolism, v. 56, n. 8, p. 1104-10, 2007.

CODDOU, C.; YAN, Z.; OBSIL, T.; HUIDOBRO-TORO, J. P.; STOJILKOVIC, S. S. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. Pharmacol Rev. v. 63, p. 641-683, 2011.

COTOMACCI, G.; SARKIS, J. J.; FURSTENAUA, C. R.; M. L. BARRETO-CHAVES. Thyroid hormones are involved in 5'-nucleotidase modulation in soluble fraction of cardiac tissue. Life Science, v. 91, n. 3-4, p. 137-142, 2012.

DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. Purinergic Signal, v. 3, n. 1-2, p. 1-3, 2007.

DIAMOND, S. L. *et al.* Systems biology of platelet-vessel wall interactions. Front Physiol, v. 4, p. 229, 2013.

DONG, Y. S. *et al.* Protective effect of quercetin against oxidative stress and brain edema in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. Int J Med Sci, v. 11, n. 3, p. 282-90, 2014.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic signaling during inflammation. N Engl J Med, v. 367, n. 24, p. 2322-33, 2012.

ENDOCRINE SOCIETY. Disponível em https://www.hormone.org/diseases-and-conditions/thyroid, 2017.

FARWELL, A. P.; BRAVERMAN, L. E. Thyroid and antithyroid drugs. *In*: Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. v. 56, cap. 39, 2006.

FORD, A. P. In pursuit of P2X3 antagonists: novel therapeutics for chronic pain and afferent sensitization. Purinergic Signal, v. 8, p. 3-26, 2012.

FUENTES, E.; PALOMO, I. Extracellular ATP metabolism on vascular endothelial cells: A pathway with pro-thrombotic and anti-thrombotic molecules. Vascul Pharmacol, v. 75, p. 1-6, 2015.

GLASS, R.; BURNSTOCK, G. Immunohistochemical identification of cells expressing ATP-gated cation

channels (P2X receptors) in the adult rat thyroid. J Anat, v. 198, p. 569-579, 2001.

GRANT, N. The role of triiodothyronine-induced substrate cycles in the hepatic response to overnutrition: thyroid hormone as an antioxidant. Med Hypotheses, v. 68, n. 3, p. 641-9, 2007.

GUSSO, G.; LOPES, J. M. C. Tratado de medicina de família e comunidade: princípios, formação e prática. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HALL, J. E. Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica. 13. ed. Rio de Janeiro: 2017.

HAMPL, R. *et al.* How short-term transdermal treatment of men with 7-oxodehydroepiandrosterone influence thyroid function. Physiol Res, v. 55, n. 1, p. 49-54, 2006.

ICHIKI, T. Thyroid Hormone and Vascular Remodeling. J Atheroscler Thromb, 2015.

IDZKO, M. *et al.* Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. Blood, v. 124, n. 7, p. 1029-37, 2014.

IWEN, K. A.; SCHRÖDER; E.; BRABANT, G. Thyroid Hormones and the Metabolic Syndrome. Eur Thyroid J, v. 2, 2013.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. Nat Rev Immunol, v. 11, n. 3, p. 201-12, 2011.

KLEIN, I.; DANZI, S. Thyroid disease and the heart. Circulation, v. 116, p. 1725-35, 2007.

KOCHUKOV, M. Y.; RITCHIE, A. K. P2X7 receptor stimulation of membrane internalization in a thyrocyte cell line. J Membr Biol, v. 204, p. 11-21, 2005.

KO, W. H. *et al.* Regulated anion secretion in cultured epithelia from Sertoli cells of immature rats. Journal of Physiology, v. 512, n.2, p. 471-480, 1998.

KWON, J. H. *et al.* P2X7 Receptor Expression in Coexistence of Papillary Thyroid Carcinoma with Hashimoto's Thyroiditis. Korean Journal of pathology. 48:30-35, 2014.

LOH, H. H.; LIM, L. L.; YEE, A.; LOH, H. L. Association between subclinical hypothyroidism and depression: an updated systematic review and meta-analysis BMC Psychiatry, v.19, n.12. 2019.

LONGCOPE, C.; BRAVERMAN, L. E.; UTIGER. R. D., Themale and female reproductive systems in thyrotoxicosis – the male and female reproductive systems in hypothyroidism. The Thyroid, p. 828-1055, 1991.

MAIA, A. L. *et al.* The Brazilian consensus for the diagnosis and treatment of hyperthyroidism: recommendations by the Thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. Arq Bras Endocrinol Metabol, v. 57, n. 3, p. 205-32, 2013.

MALMSJO, M.; EDVINSSON, L.; ERLINGE, D. P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. Eur J Pharmacol, v. 390, n. 1-2, p. 173-80, 2000.

MAYER, O., JR. *et al.* Hypothyroidism in coronary heart disease and its relation to selected risk factors. Vasc Health Risk Manag, v. 2, n. 4, p. 499-506, 2006

MARAN, R. R. M.; *et al.* Impact of neonatal onset hypothyroidism on Sertoli cell number, plasma and testicular interstitial fluid androgen binding protein concentration. Endocrine Research, v. 25, n. 3-4, p. 307-322, 1999.

NOGUEIRA, C. R. *et al.* Hipotireoidismo: Diagnóstico. Diretrizes clínicas na saúde suplementar: Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo, 2011.

RHOADES, R. A.; TANNER, G. A. Fisiologia Médica. v. 2. Guanabara Koogan, 2005.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signal, v. 2, n. 2, p. 409-30, 2006.

SALLES, II *et al.* Inherited traits affecting platelet function. Blood Rev, v. 22, n. 3, p. 155-72, 2008.

SANTI, A. *et al.* Effects of quercetin on oxidative stress biomarkers in methimazole – induced hypothyroid rats. Exp Clin Endocrinol Diabetes, v. 122, n. 9, p. 533-9, 2014.

SANTI, A. *et al.* Association between thyroid hormones, lipids and oxidative stress biomarkers in overt hypothyroidism. Clin Chem Lab Med, v. 48, n. 11, p. 1635-9, 2010.

SAWYNOK, J. Adenosine receptor targets for pain. Neuroscience, v. 338, p. 1-18, 2016.

SCHETINGER, M. R. C. *et al.* NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. Biofactors, v. 31, n. 2, p. 77-98, 2007.

SCHMATZ, R. *et al.* Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sci., v. 84, n. 11-12, p. 345-50, 2009.

SEIFERT, A. *et al.* The cellular localization of autotaxin impacts on its biological functions in human thyroid carcinoma cells. Oncology reports, v. 19, p. 1485-1491, 2008.

SILVA, A. *et al.* Principais distúrbios tireoidianos e suas abordagens na atenção primária à saúde. Revista da AMRIGS, v. 55, n. 4, 2011.

SILVEIRA, G. F.; BUFFON, A.; BRUNO, A. N. New approaches to thyroid hormones and purinergic signaling. J Thyroid Res, v. 2013, p. 1-8, 2013.

SOLINI, A. *et al.* Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease? Endocrinology, v. 149, n. 1, p. 389-396, 2008.

SQUIZZATO, A. *et al.* Clinical review: Thyroid dysfunction and effects on coagulation and fibrinolysis: a systematic review. J Clin Endocrinol Metab, v. 92, n. 7, p. 2415-20, 2007.

STATHATOS, N. Thyroid physiology. Med Clin North Am, v. 96, n. 2, p. 165-73, 2012.

STEFANELLO, N. *et al.* Effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on components of the purinergic system of streptozotocin-induced diabetic rats. J Nutr Biochem, v. 38, p. 145-153, 2016.

STOJILKOVIC, S. S.; ZEMKOVA, H. P2X receptor channels in endocrine glands. WIREs Membr Transp Signal, v. 2, p. 173-180, 2013.

STUIJVER, D. J. *et al.* The effect of hyperthyroidism on procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic factors: a systematic review and meta-analysis. Thromb Haemost, v. 108, n. 6, p. 1077-88, 2012.

VANDERPUMP, M. P. The epidemiology of thyroid disease. Br Med Bull, v. 99, p. 39-51, 2011.

WHITE, S. S. Hypothyroidism. *In*: (ed.). Thyroid Disease – Understanding Hypothyroidism and Hyperthyroidism.: Harvard Health Publications, p. 14-30, 2010.

ZANINI, D. *et al.* Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. Biomed Pharmacother, v. 66, n. 1, p. 40-5, 2012.

DIABETES MELLITUS E O SISTEMA PURINÉRGICO

Naiara Stefanello
Karine Paula Reichert

DIABETES MELLITUS: DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

O diabetes representa um dos maiores problemas de saúde pública do mundo e vem tomando proporções epidêmicas nos últimos anos. As complicações dessa doença trazem perda econômica substancial para os doentes e suas famílias, para os sistemas de saúde e para as economias nacionais, devido aos custos médicos diretos, à perda de trabalho e salários. Além desses aspectos, de acordo com o estatuto da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018, foi estimado que mais de 420 milhões de pessoas possuíam diabetes, sendo a sétima causa de morte em 2016. Essa prevalência está associada principalmente a fatores de risco, como obesidade e sobrepeso. Dados da OMS demonstram que mais de um em três adultos acima de 18 anos tem sobrepeso e mais de um em dez é obeso. Em 2016, a estimativa era de que 1,6 milhão de mortes foram diretamente causadas pelo diabetes. Outras 2,2 milhões de mortes foram atribuídas à glicemia elevada em 2012 (World Health Organization, 2019).

Na América do Sul e no México, foram 209.717 adultos de 20-79 anos que morreram como resultado do diabetes (11% de todas as causas de morte); 44,9% dessas mortes aconteceram em pessoas com menos de 60 anos de idade. Metade dessas mortes foi no Brasil. Além disso, o Brasil é o sexto país do mundo em gastos com diabetes, porém, quando se considera o gasto por pessoa, o

Brasil não se estabelece entre os dez países que têm maior investimento médio por individuo com diabetes (IDF, 2017).

Caracterização e classificação do diabetes

O diabetes mellitus (DM) é um grupo heterogêneo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina e ou na ação da insulina (Classification and diagnosis of diabetes, 2017). A patogênese dessa doença está relacionada a mudanças no metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos graxos que levam a alterações na sinalização do hormônio insulina. Essas alterações são decorrentes da destruição autoimune das células β pancreáticas com deficiência de insulina e também de uma falha na ação da insulina decorrente da diminuição da sensibilidade à insulina (Gannon, 2001; Classification and diagnosis of diabetes, 2017).

De acordo com diferentes características, pode-se dividir o diabetes em grupos. Diabetes tipo 1 afeta entre 5-10% das pessoas com essa doença. Pode ser conhecida como diabetes insulino-dependente (Gannon, 2001) ou diabetes juvenil (World Health Organization-Department of Noncomunicable Disease Surveillance Geneva, 1999). É resultado de uma destruição autoimune das células β do pâncreas. Diferentes tipos de autoanticorpos foram encontrados para as células das ilhotas, insulina, descarboxilase do ácido glutâmico e para o insulinoma-2. Usualmente, um ou mais desses autoanticorpos estão presentes quando a hiperglicemia é detectada nesses pacientes. Essa destruição autoimune é variável, ocorrendo de forma rápida em alguns casos, como em crianças e jovens, e de forma lenta em adultos. Especificamente, alguns pacientes apresentam a cetoacidose como a primeira manifestação da doença. Outros casos apresentam uma modesta hiperglicemia de jejum que rapidamente evolui para uma hiperglicemia severa e associada ou não com a cetoacidose e na presença de algum outro fator desencadeante, como o estresse ou infecções. Em outros casos, a destruição das células β ocorre, mas permanece uma função residual decorrente de uma destruição incompleta dessas células, o que pode prevenir a cetoacidose por muito tempo, contudo, a pessoa desenvolverá, eventualmente, a dependência à insulina. Esses casos são mais frequentes em adultos do que em crianças (Classification and diagnosis of diabetes, 2017). Em alguns casos

de DM tipo 1, não se sabe a etiologia, pois apresentam insulinopenia e cetoacidose, no entanto não apresentam evidências de autoimunidade; nesses casos, pode ser classificada como diabetes idiopática.

A forma mais predominante é o diabetes mellitus tipo 2, devido à sua prevalência em 90-95% dos casos. Também pode ser chamada de diabetes não insulino dependente (Gannon, 2001) ou diabetes do adulto (World Health Organization-Department of Noncomunicable Disease Surveillance Geneva, 1999). Os pacientes apresentam resistência à insulina e possuem uma relativa deficiência de insulina. Os fatores que levam ao desenvolvimento do DM tipo 2 estão relacionados com a obesidade, a qual por si só pode levar à diminuição da sensibilidade à insulina (Roberts-Toler *et al.*, 2015). Esses pacientes parecem possuir os níveis de insulina normais ou elevados com o intuito de compensar a resistência à insulina, a qual pode ser diminuída com a redução de peso ou tratamento farmacológico. Além disso, o risco de desenvolver diabetes tipo 2 aumenta com a idade e o sedentarismo (Ligthart *et al.*, 2016; Rockette-Wagner *et al.*, 2015).

Por muito tempo, o diabetes mellitus gestacional (DMG) era definido somente por uma intolerância à glicose durante a gravidez, independente de essa condição persistir ou não depois da gestação. Mulheres com diabetes no primeiro trimestre de gravidez seriam classificadas no grupo do DM tipo 2. Mulheres grávidas com diagnóstico de diabetes no segundo ou terceiro trimestre de gravidez que não é, claramente, DM tipo 1 ou tipo 2 são classificadas como DMG (Classification and diagnosis of diabetes, 2017). As características do DMG estão relacionadas com a diminuição da glicose plasmática e com a sensibilidade à insulina, além de ocorrer uma alteração na liberação de citocinas inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF-α), o qual pode contribuir para a resistência à insulina (Baz *et al.*, 2016).

Há também outros tipos específicos de diabetes: 1) defeito genético nas células β, que se caracteriza como um diabetes familiar com idade de diagnóstico precoce e transmissão autossômico-dominante (revelado pela presença de três gerações de mesma linhagem afetadas) associado a defeitos no âmbito da secreção de insulina, levando à definição como DM tipo MODY (Schober *et al.*, 2009); 2) defeitos genéticos na ação da insulina, que, em alguns casos incomuns de diabetes, levam a alterações nos receptores de insulina, o que causa também uma resistência à insulina grave. Outros fatores que podem levar ao

desenvolvimento do diabetes são: 3) doenças do pâncreas exócrino, como pancreatites, traumas, infecções e cânceres pancreáticos; 4) endocrinopatias, em que alguns hormônios antagonizam o efeito da insulina e, portanto, quando em excesso, podem levar ao desenvolvimento do diabetes; 5) drogas, algumas das quais podem alterar direta ou indiretamente as ações da insulina, glicocorticoides, agonistas β-adrenérgicos e outros; 6) infecções por certos vírus, que têm sido associadas com a destruição das células β; e 7) outras síndromes, como algumas síndromes genéticas que são acompanhadas por hiperglicemia, a exemplo da síndrome de Down (Baynest, 2015; World Health Organization-Department of Noncomunicable Disease Surveillance Geneva, 1999). Dependendo do indivíduo e também do período em que a patologia foi diagnosticada, não há como ser classificada em um só grupo. Uma pessoa com diabetes gestacional pode não se recuperar da hiperglicemia e evoluir para um quadro de diabetes tipo 2.

Mecanismo de liberação da insulina

Normalmente, a sinalização da insulina é mediada pelo pâncreas, onde o transportador de glicose (GLUT) 2 medeia a entrada da glicose na célula. Após entrar na célula β, a glicose é fosforilada, pela hexocinase, à glicose-6-fosfato, que seguirá preferencialmente para a glicólise e produção de piruvato. Em seguida, segue para a produção de acetil-CoA e ciclo do ácido cítrico. Finalmente, leva à produção de ATP, o qual promove o fechamento dos canais de K+ sensíveis a ATP. O efluxo reduzido de K+ despolariza a membrana celular e os canais de cálcio voltagem-dependentes se abrem, aumentando nos níveis de cálcio citosólico, culminando com secreção dos grânulos de insulina por exocitose. A insulina liberada na corrente sanguínea atingirá diferentes tecidos, tais como tecido adiposo e muscular, onde irá ligar-se a seu receptor e levará à inserção do transportador de glicose dependente de insulina respectivo na membrana plasmática; então, a glicose pode ser captada nesses tecidos. No caso do diabetes, não há a presença da insulina ou a insulina é resistente; assim, os transportadores de glicose não se inserem na membrana plasmática, e a glicose permanece na corrente sanguínea, caracterizando a hiperglicemia (Antonioli *et al.*, 2015).

Esse quadro pode ser mimetizado de forma satisfatória em modelos animais, em que se pode induzir uma hiperglicemia por diferentes formas: por manipulação genética, mudanças na dieta, cirurgicamente ou por manipulação química. Um exemplo de seleção genética é a linhagem de camundongos do tipo NOD, os quais são importantes para se compreender a patogênese do DM tipo 1, devido ao fato de desenvolverem espontaneamente a patologia. Embora algumas características desenvolvidas possam ser diferentes das características humanas, estudos com esses animais são muito úteis para o desenvolvimento de formas de prevenção. Outro exemplo são os ratos BB, uma seleção de ratos Wistar que desenvolvem espontaneamente hiperglicemia. Contudo, ambos são modelos para DM tipo 1. Para estudar o DM tipo 2, os ratos Zuckerfatty apresentam mutação no receptor de leptina, promovendo a hiperfagia e obesidade em quatro semanas, o que leva tardiamente à resistência à insulina e também ao diabetes (King; Bowe, 2016). O diabetes tipo 2 também pode ser induzido através da manipulação da dieta, a qual é alterada para um maior consumo de carboidratos e/ou gordura para a promoção de ganho de peso, que está associada com a resistência à insulina e alteração no metabolismo da glicose e gorduras, podendo levar ou não ao desenvolvimento do DM tipo 2 (Lozano *et al.*, 2016; Srinivasan *et al.* (2005).

A estreptozotocina (STZ) (Stefanello *et al.*, 2014) ou o Aloxano (Lunkes *et al.*, 2004) são compostos químicos que também podem induzir modelos experimentais de diabetes através da manipulação química. Essas drogas são absorvidas pelo GLUT 2 do pâncreas por possuírem uma estrutura semelhante à glicose (Schnedl *et al.*, 1994). A STZ leva à depleção do ATP e também à produção de espécies reativas que contribuem para o dano no DNA. Ambas levam à morte das células β. Doses de 100-200 mg/kg em camundongos e de 50-60 mg/kg em ratos levam à hiperglicemia (Okizaki *et al.*, 2015; Stefanello *et al.*, 2016). O diabetes pode ser estudado pela retirada parcial do pâncreas através da manipulação cirúrgica. Pode-se avaliar os efeitos da glicemia na redução da massa de células β, bem como avaliar a sua regeneração. Além disso, todos esses modelos podem ser aplicados de forma somatória, podendo-se associar, por exemplo, modelos de dieta com a administração de STZ, bem como a remoção do pâncreas associado ao uso da STZ. De certa forma, todos levam a um denominador comum, a hiperglicemia (Hardikar *et al.*, 1999; Schmatz *et al.*, 2009).

Diagnóstico do diabetes

A hiperglicemia pode ser diagnosticada através de alguns critérios preconizados pela Associação Americana de Diabetes (ADA – American Diabetes Association), que se baseia nos níveis de glicose plasmática após oito horas de jejum ou através do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) realizado após duas horas da ingestão de 75 g de glicose. Ou ainda pode se associar outros critérios, como a hemoglobina glicosilada (HbA1C). Um quarto critério pode se basear nos sintomas clássicos da hiperglicemia ou crises hiperglicêmicas associadas com uma glicose plasmática de ≥200 mg/dL (11,0 mmol/L). Os valores para diagnóstico de hiperglicemia podem ser definidos por 100-125 mg/dL (5,6-6,9mmol/L) para glicemia de jejum e 140-199 mg/dL (7,8-11,0 mmol/L) para o TOTG. Para os níveis de HbA1C, considera-se que indivíduos que apresentam entre 5,7-6,4% (39-46 mmol/L) apresentam maiores riscos para o desenvolvimento do diabetes (Classification and diagnosis of diabetes, 2017).

Entretanto, as doenças metabólicas, como o diabetes, geralmente já estão presentes antes de serem diagnosticadas clinicamente e, muitas vezes, algumas das complicações comuns já estão sendo manifestadas. Os sintomas clássicos desta patologia são poliúria, polidipsia, polifagia e perda involuntária de peso; o diabetes, porém, é assintomático na maioria dos casos, o que retarda o diagnóstico e o tratamento (Atkinson; Eisenbarth, 2001; Brasil.Ministério da Saúde, 2006).

Complicações do diabetes

A longo prazo, o desequilíbrio metabólico do diabetes pode levar a danos, disfunções ou até falência em vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos (Rahimi *et al.*, 2005). Dessa forma, pacientes com DM estão mais susceptíveis a desenvolver complicações macro e microvasculares, que são as principais causas de morbidade e mortalidade do diabetes.

A hiperglicemia crônica é a maior causa de complicações no diabetes e é a responsável por levar à morte os pacientes. Embora o DM tipo 1 e tipo 2 tenham uma patogênese diferente, as complicações provenientes da hiperglicemia são semelhantes. As complicações microvasculares são a retinopatia,

neuropatia e nefropatia. A hiperglicemia é responsável por muitas das mudanças na vasculatura da retina, incluindo prejuízo no fluxo sanguíneo, aumento da adesão de leucócitos e monócitos e obstrução de capilares, resultando em hipóxia localizada (Sheetz; King, 2002). As manifestações clínicas da neuropatia são dor, parestesia e perda sensorial, o que aumenta o risco de queimaduras, lesões e ulceração do pé. Estão relacionadas com espessamento da membrana, proliferação e hipertrofia das células endoteliais, além da tensão de oxigênio reduzida (Tesfaye; Selvarajah, 2012). A nefropatia é bem caracterizada, com o acúmulo de matriz extracelular que progride para hipertrofia e hiperfiltração e posterior inflamação do glomérulo. Por último, leva à apoptose das células. Três são as principais vias de indução da progressão da nefropatia: 1) ativação das vias de polióis e proteína cinase C (PKC), 2) formação de produtos finais de glicação avançada e 3) hipertensão intraglomerular (Wada; Makino, 2012).

As complicações macrovasculares estão relacionadas com doença vascular periférica, infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico. A hiperglicemia através dos produtos de glicação avançada (AGE) promove a ativação do fator nuclear-κB (NF-κB), que modula vários genes alvo pró-inflamatórios e pró-ateroclеróticos nas células do músculo liso vascular, células endoteliais e macrófagos (Casella *et al.*, 2015). O NF-κB estimula os monócitos a se infiltrarem no espaço subendotelial. Com a hiperglicemia, os macrófagos aderem-se e aumentam a expressão de genes pró-inflamatórios e moléculas de adesão endotelial, contribuindo para a iniciação da formação da placa aterosclerótica. Pode-se salientar que a hiperglicemia está relacionada com o aumento na atividade da NADPH oxidase, enzima geradora de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que leva a uma contribuição no estresse oxidativo, também relacionado com a disfunção endotelial (Gray *et al.*, 2013).

Além disso, os altos níveis de glicose e EROs levam à inibição da produção de óxido nítrico (NO), contribuindo ainda mais para a disfunção endotelial vascular (Sena *et al.*, 2013). Relacionado com as alterações macrovasculares, pode-se destacar também que o aumento da produção de EROs contribui para a modificação e oxidação do LDL (lipoproteínas de baixa densidade), as quais estão intimamente relacionadas com a progressão da placa aterosclerótica e, consequentemente, com alterações nos vasos (Barona *et al.*, 2012).

Os mecanismos pelos quais a hiperglicemia pode estar relacionada com as complicações do diabetes podem ser os seguintes: 1) via dos polióis, 2)

formação de AGE, 3) EROs intermediárias e 4) PKC (Sheetz; King, 2002). A via dos polióis leva à produção de sorbitol e consumo de NADPH pela aldose-redutase, que é ativada com o aumento da glicose plasmática. O sorbitol promove alterações osmóticas na célula e desenvolvimento da catarata, enquanto o sorbitol e o aumento de NADP+ podem contribuir com lesões vasculares. Na via de formação de AGE, as proteínas são glicosiladas pela glicose, a chamada reação de Maillard. Essas proteínas têm um prejuízo em sua função. Tanto as proteínas intracelulares como as estruturais, como o colágeno, podem sofrer essa glicosilação (Genuth *et al.*, 2015). Os receptores para AGE (RAGE), quando ativados, podem promover a morte celular (Liu *et al.*, 2016). No metabolismo normal da glicose a ATP, ocorre a produção de espécies reativas na cadeia transportadora de elétrons (Nishikawa *et al.*, 2000). Além disso, a autoxidação da glicose também leva à produção de espécies reativas e à glicação de proteínas (Chetyrkin *et al.*, 2011; Hunt *et al.*, 2015).

A PKC é uma enzima sinalizadora intracelular muito importante, responsável pela regulação de muitos processos (Wu-zhang; Newton, 2013). A ativação da PKC, juntamente com o aumento das espécies reativas sob condição de hiperglicemia estão relacionados com o desenvolvimento da nefropatia diabética (Zhu *et al.*, 2015). Em adição, a ativação da PKC leva a alterações na permeabilidade vascular, desregulação no NO, aumento da adesão de leucócitos e alteração no fluxo sanguíneo (Sheetz; King, 2002). Todas as alterações nessas vias contribuem para as complicações observadas no diabetes (Schulingkamp *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2010). Algumas complicações são em tecidos específicos, e alguns desses importantes tecidos serão descritos nas próximas seções. Esses tecidos sofrem amplas alterações em diferentes vias de sinalização, entre as quais está a purinérgica, que destacaremos na próxima seção.

Sistema Purinérgico

As purinas (ATP, ADP e adenosina) e as pirimidinas (UDP e UTP) são importantes moléculas sinalizadoras que medeiam muitos efeitos biológicos através dos receptores purinérgicos (Burnstock; Verkhratsky, 2012). O ATP, ADP, UTP e UDP ligam-se aos receptores P2, enquanto a adenosina se liga a receptores P1.

Tanto os receptores P1 quanto P2 estão localizados em muitos tecidos, principalmente pâncreas, sistema vascular, sistema nervoso central (Burnstock; Evans; *et al.*, 2014; Coutinho-Silva *et al.*, 2007; Delekate *et al.*, 2014; Hechler; Gachet, 2015). No SNC, está descrita a presença desses receptores em muitas estruturas, sendo associada também com o desenvolvimento de diversas patologias, como doença de Alzheimer (Delekate *et al.*, 2014; Gold; El Khoury, 2015), enquanto esses receptores, principalmente os P2Y, estão relacionados com a função plaquetária e a promoção de trombos (Hechler; Gachet, 2015). As plaquetas são conhecidas por expressar os receptores P2X1, P2Y1, e P2Y12, nos quais predomina a sinalização por ADP através da ativação dos receptores P2Y1 e P2Y12, que é crítica para iniciação da agregação plaquetária (Eltzschig *et al.*, 2012; Idzko *et al.*, 2014; Schmatz *et al.*, 2013). Os receptores P2X7 e o P2X4, por exemplo, estão presentes no rim, e sua expressão pode ser aumentada em patologias envolvendo processos inflamatórios nesse tecido (Solini *et al.*, 2014). Os purinoreceptores estão envolvidos com a secreção biliar, metabolismo do glicogênio e lipídico. A ativação dos receptores de P2Y1 em hepatócitos humanos e roedores estimula a enzima glicogênio fosforilase (Burnstock; Vaughn; *et al.*, 2014). No pâncreas, os receptores purinérgicos são muito importantes, pois o ATP, através dos receptores P2Y1, está relacionado com a liberação de insulina. Nas ilhotas pancreáticas, o P2X4 está expresso nas células β e δ (Burnstock; Novak, 2013). Já nas células α, são expressos os receptores P2X7 que migram para o centro da ilhota à medida que as células β são destruídas em modelos animais de diabetes (Coutinho-Silva *et al.*, 2007).

Os receptores de ADO estão amplamente distribuídos em tecidos metabolicamente ativos, tais como pâncreas, fígado e tecido adiposo, além de estarem presentes em células do sistema imune, indicando um importante papel na regulação desses tecidos. No pâncreas, a ADO está relacionada com o metabolismo da glicose (Koupenova; Ravid, 2013), bem como com a secreção da insulina, e ainda controla a regeneração e proliferação das células β. O receptor A1 inibe a liberação de insulina e o A2A tem um efeito oposto, estimulando a secreção de insulina, enquanto o A2B não tem efeito descrito na estimulação desse hormônio. A ADO também está envolvida no desenvolvimento do DM tipo 1, devido à sua interação com as células imunes e as células β, onde o receptor A2A inibe a secreção de IL-2 e IFN-γ pelas células T CD4+ e células T helper e ainda suprime os linfócitos T CD8+ (Antonioli *et al.*, 2015). Em

adição, camundongos knockout para CD39 tratados com STZ desenvolvem diabetes mais rapidamente que camundongos wild-type e, ainda, a upregulation da CD39 tem efeito protetor na indução do diabetes. Isso poderia contribuir com o aumento na produção de ADO e estimulação dos seus receptores (Chia *et al.*, 2013).

Além disso, a sinalização da insulina e a consequente resistência a esse hormônio no DM tipo 2 podem ser inibidas pela liberação de citocinas pró-inflamatórias liberadas por infiltrados de macrófagos e outras células imunes no fígado, músculo, pâncreas e tecido adiposo. Os receptores de ADO também estão relacionados com efeitos antagônicos nesses tecidos. O receptor A1 inibe a lipólise e o receptor A2B diminui o processo inflamatório nos adipócitos, enquanto nos hepatócitos, esses receptores estão relacionados com a gliconeogênese e glicogenólise. No músculo, podem estimular ou diminuir a captação de glicose. De forma geral, a ADO e seus receptores contribuem para a diminuição da resistência à insulina (Antonioli *et al.*, 2015).

Estudo com pacientes com DM tipo 2 não obesos tem demonstrado que a atividade ou expressão da enzima ADA se encontra aumentada, o que contribui com a diminuição dos níveis de ADO (Khemka *et al.*, 2013; Kurtul *et al.*, 2004). Além disso, o aumento da expressão da ADA promove a ativação das células dendríticas através da diminuição da ADO, levando à desregulação das células T autoimunes e à autodestruição das células β pancreáticas (Antonioli *et al.*, 2015).

Cada tecido responde a hiperglicemia de forma diferenciada, dar-se-á destaque a alguns tecidos importantes que sofrem mudanças e são amplamente pesquisados.

Pâncreas

O pâncreas é um órgão que contém duas populações distintas de células: as células exócrinas, que secretam enzimas no trato digestivo; e as células endócrinas, que secretam hormônios na corrente sanguínea. As células endócrinas são agrupadas principalmente nas ilhotas de Langerhans, que são aglomerados esféricos compactos no tecido exócrino. Existem quatro tipos principais de células endócrinas: as células β, que secretam insulina e compõem a maioria

das células nas ilhotas; as células α, secretadoras de glucagon; as células δ, que secretam somatostatina; e as células PP, que secretam polipeptídeo pancreático (PP) (Edlund, 2001). As células β são as mais envolvidas no desenvolvimento do diabetes, como citado anteriormente. No diabetes mellitus tipo 1, devido a fatores ambientais, ocorre uma destruição dessas células que produzem insulina. Como resultado, a massa e função das células β pancreáticas são destruídas, e os pacientes tornam-se dependentes de insulina exógena. No diabetes tipo 2, a secreção de insulina pode estar próxima do normal, pelo menos no início, mas os tecidos-alvo podem ser resistentes à insulina. Com a progressão da doença, os fatores de estresse metabólico e as citocinas, como a interleucina IL-1β, contribuem para diminuir a massa e a função das células β (Burnstock; Novak, 2013).

Igualmente, o pâncreas também é regulado pelo sistema purinérgico. Estudos têm demonstrado que algumas ectonucleotidases estão relacionadas com a quebra do ATP a adenosina. Nas ilhotas pancreáticas, ATP pirofosfatase, fosfatase alcalina, ecto-5'-nucleotidase e NTDPase1-3 foram encontrados (Lavoie *et al.*, 2010). De modo geral, ATP estimula a secreção de insulina enquanto que adenosina através dos receptores A1 medeiam a inibição da secreção de insulina e que receptores A2A atuam aumentando a proliferação de células β (Andersson *et al.*, 2012; Burnstock; Novak, 2013). Estudos com humanos e animais demonstram que alguns receptores purinérgicos são encontrados nas células β e que outros são encontrados nas células α. Contudo, poucos estudos têm sido conduzidos com as células α. Os receptores P2X1 – P2X7, PY1, P2Y2, P2Y4 e P2Y6, P2Y11 – P2Y13 foram encontrados nas células β. A presença dos receptores P2X1, P2X2, P2X4 e P2X6, presentes em ratos, não foi confirmada em células humanas (Cieślak; Roszek, 2014). Mas foi confirmado que as células β humanas apresentam receptores P2X3 (Jacques-Silva *et al.*, 2010), receptores P2X5, receptores P2X7 (Burnstock, 2013). Em condições fisiológicas, o receptor P2X7 não está envolvido no metabolismo das células β, pois a ativação desse receptor exige altas concentrações de ATP acima de 100 mM (Di Virgilio; Vuerich, 2015).

Os grânulos nas células pancreáticas contêm não apenas insulina, mas também ATP e ADP, e sua liberação é regulada pela ativação do receptor P2X2 presente nas células β (Karanauskaite *et al.*, 2009). ATP é liberado juntamente com insulina nas células β em resposta a uma rápida diminuição nos níveis de

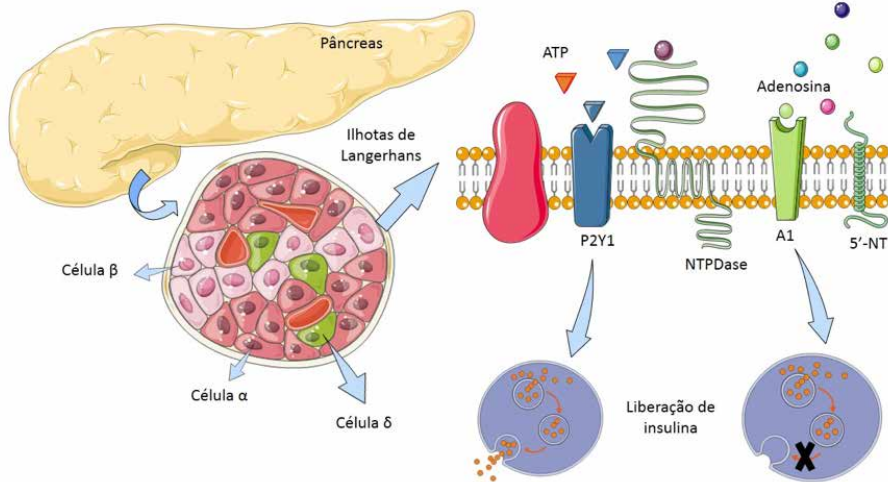
glicose no sangue ativa o receptor P2X3, que resulta no aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular e amplificação da liberação de insulina (Jacques--Silva *et al.*, 2010).

Existem inúmeros receptores P2Y presentes nas células β do pâncreas, e sua expressão é diferente entre as espécies animais. Estudos em células de tumorais de ilhotas pancreáticas (insulinoma) indicaram a presença de receptores P2Y, como P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12 e P2Y13 (Santini *et al.*, 2009). Em humanos, foi demonstrada a presença dos receptores P2Y11 e P2Y12 nas células β pancreáticas (Burnstock, 2013).

Cieślak e Roszek (2014) reuniram informações de diferentes receptores P2Y e seus efeitos nas células do pâncreas, pois alguns estudos relatam que a ativação de receptores P2Y pode aumentar ou diminuir a secreção de insulina, dependendo do subtipo de receptor. A maioria dos estudos mostram que a ativação dos receptores P2Y e P2Y4 estimula a secreção de insulina induzida por glicose e que a ativação dos receptores P2Y1 e P2Y6 inibe a secreção de insulina. Outro estudo sobre os mesmos receptores mostrou que a ativação dos receptores P2Y1 e P2Y6 estimula a secreção de insulina quando altas concentração de glicose são encontradas (Cieślak; Roszek, 2014).

Algumas alterações são mais proeminentes em pâncreas diabético. Burnstok e Novak (2013) têm destacado em sua publicação que algumas mudanças são observadas no pâncreas diabético, dentre as quais se podem citar: os receptores P2Y1 estavam presentes nos capilares intra-ilhota, enquanto os receptores P2X4 estavam presentes nas células β e δ; os receptores P2X7 são encontrados migrando para o centro das células α para substituir as células β perdidas em ratos diabéticos induzidos por STZ e com camundongos NOD (Burnstock; Novak, 2013; Coutinho-Silva *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2016).

Estudos têm demonstrado que a sinalização dos receptores P2Y, principalmente P2Y1, se mantém, embora haja a destruição das células β. No pâncreas de ratos, ADPβS, um potente agonista do receptor P2Y1 induziu liberação de insulina similar à dos ratos controle, e isso foi independente da concentração de glicose (Tang *et al.*, 2017). Agonistas para esse receptores seriam uma medida interessante para a estimulação de insulina principalmente no diabetes mellitus tipo 1, contudo, esse receptor está presente nas células endoteliais e contribuem para a promoção da vasodilatação, efeito colateral não desejado para esses pacientes (Novak, 2008), como se observa na Figura 1.

Figura 1: Sinalização do sistema purinérgico no pâncreas

Fonte: autoras (2019).

* Alguns receptores P2 têm efeitos descritos e contraditórios. Estudos têm demonstrado que P2Y1 pode estar associado com um aumento na liberação de insulina. Por sua vez, receptores P1 também precisam de mais estudos para consolidar o efeito do sistema purinérgico, mas algumas evidências demonstram que o receptor A1 pode estar ligado com uma sinalização deficiente da insulina.

A presença do receptor de adenosina também foi demonstrada nas células β pancreáticas, principalmente os receptores A2A e A1. Estudos com antagonistas da adenosina não seletivos mostraram que a adenosina pode melhorar a secreção de insulina e reduzir a produção de glicose. Estudos com Zebrafish demonstraram que o agonista de adenosina 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA) apresentou capacidade de regeneração de células β através do receptor de adenosina A2A, aumentando a proliferação de células β e acelerando a restauração da normoglicemia no peixe-zebra (Andersson *et al.*, 2012). Por outro lado, os antagonistas do receptor A2B recém-sintetizados PSB-1115 e PSB-53 apresentaram potencial antidiabético indicado pela diminuição dos níveis de

glicose no sangue e aumento dos níveis de insulina plasmática em ratos Wistar em doses distintas, e insulina plasmática elevada em ratos diabéticos *in vivo* e liberação aumentada de insulina *in vitro* (Rüsing *et al.*, 2006). Em adição, parece que camundongos A1 (-/-) têm distúrbios na secreção de insulina e glucagon no pâncreas quando estimulados por 16.7 mM glicose (Johansson *et al.*, 2007), o que é ilustrado pela Figura 1. Diversos estudos têm demonstrado a influência dos P1 e P2 receptores na sinalização da insulina em pâncreas e mais estudos precisam ser feitos para que a forma como o sistema purinérgico modula o pâncreas seja bem esclarecida.

Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central (SNC) é um tecido bastante complexo, com uma variedade de tipos celulares, os quais são capazes de coordenar todo o organismo, através de ações voluntárias e involuntárias. Por mais que o SNC represente uma pequena porcentagem do nosso peso corporal, ele é responsável por aproximadamente 20% do consumo total de O2 e 25% de glicose no organismo, apresentando reservas energéticas extremamente baixas quando comparada a sua elevada taxa metabólica. Dessa forma, o metabolismo cerebral requer um suprimento contínuo de glicose, para a manutenção da sua fisiologia e funcionamento, sendo que os neurônios são as células do SNC que mais requerem energia nas atividades sinápticas (Biessels *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2012).

No caso do DM, a desregulação metabólica da glicose, pode causar danos diretos ao cérebro devido ao fato da restrita internalização desta fonte energética para as células nervosas. Além disso, a insulina também exerce um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento de tecidos e está envolvida em processos de aprendizagem e memória. A diminuição na concentração de insulina no sistema nervoso central contribui para o declínio cognitivo, uma vez que os receptores de insulina encontram-se amplamente distribuídos em estruturas cerebrais como córtex e hipocampo (Bondy; Cheng, 2004; Chiu *et al.*, 2008; Zhao; Alkon, 2001).

Estudos têm demonstrado que pacientes diabéticos apresentam um risco elevado em desenvolver doenças cerebrovasculares como o acidente vascular

cerebral, encefalopatia diabética, doença de Alzheimer e outras demências (Kapogiannis; Mattson, 2011; Luchsinger, 2008). Podem ser chamadas de "encefalopatias diabéticas" as alterações provocadas pela hiperglicemia no encéfalo, contudo essa denominação não é amplamente aceita pelos pesquisadores Nelson *et al.* (2009), pois, de acordo com Mijnhout e colaboradores (2006), não parecem combinar com os leves problemas cognitivos geralmente vistos em pacientes diabéticos. Então, tem sido sugerido que o termo "declínio cognitivo associado ao diabetes" descreve um estado de ligeira a moderada disfunção cognitiva, em particular retardamento psicomotor e reduzida flexibilidade mental, que não são atribuíveis a outras causas (Mijnhout *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2016).

Além disso, alguns estudos têm apresentado que a hiperglicemia induz a declínio cognitivo resultante de anormalidades estruturais e funcionais no encéfalo (Biessels *et al.*, 2002). Essas alterações poderiam estar relacionadas com defeitos na potenciação a longo prazo em fatias de hipocampo, o qual está intimamente relacionado com a capacidade do encéfalo em formar memória (Biessels *et al.*, 2002; Trudeau *et al.*, 2004). A hiperglicemia também pode levar ao aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica, o que pode contribuir com a reatividade vascular e o envelhecimento acelerado da parede vascular (Coleman *et al.*, 2004).

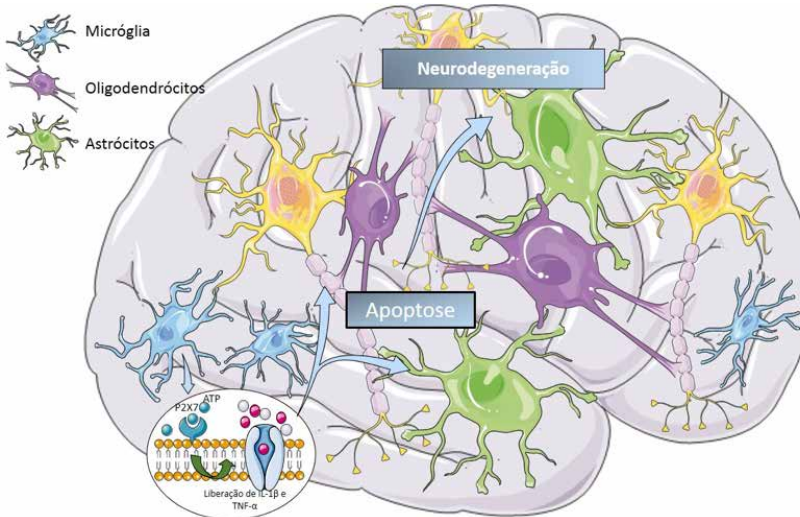
Esses sintomas estão também relacionados ao sistema purinérgico, uma vez que o ATP é um neurotransmissor excitatório, armazenado em vesículas sinápticas nos terminais nervosos sendo liberado junto com outros neurotransmissores. Além da ativação neuronal, o ATP também possui uma função de mensageiro neurônio-glia e marcador inflamatório. Todas as funções que este nucleotídeo pode vir a desenvolver sob condições fisiopatológicas intervêm da sua ligação com seus diferentes receptores (citados na seção anterior).

Em ratos diabéticos induzidos com STZ, foi demonstradopor Duarte e colaboradores (2007) diminuição das concentrações de ATP no líquido cefalorraquidiano e análise por Western blot mostrou que a densidade de vários receptores P2 (P2X (3,5,7) e P2Y (2,6,11) estava diminuída nos terminais nervosos do hipocampo. Isso indica que a sinalização sináptica de ATP está globalmente deprimida em ratos diabéticos, o que pode contribuir para a diminuição da plasticidade sináptica associada ao diabetes (Duarte *et al.*, 2007).

Alterações no metabolismo do ATP e uma deficiência na sinalização intracelular induzida por este nucleotídeo podem resultar na disfunção neurotransmissora

(Duarte *et al.*, 2007; Reichert *et al.*, 2018). Ainda mudançasnas atividades da Ca^{2+} e Na^{+}, K^{+} -ATPase provocam morte neuronal devido aos distúrbios nos eletrólitos intracelulares, como observado por Stefanello *et al.* (2014) no diabetes induzido por STZ.

Além disso, o diabetes é associado com a inflamação crônica, e o sistema purinérgico é capaz de desencadearum mecanismo neuroinflamatórioem resposta a processos danosos no SNC. Na microglia, células imunes do SNC, a ativação do receptor P2X7 pode levar a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1β (IL-1β) e fator de necrose tumoral α (TNFα) (Solini *et al.*, 2008). A ativação do P2X7 pode levar a processos de morte celular, principalmente, por apoptose, favorecendo condições para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Anderson; Nedergaard, 2006), como mostra a próxima figura.

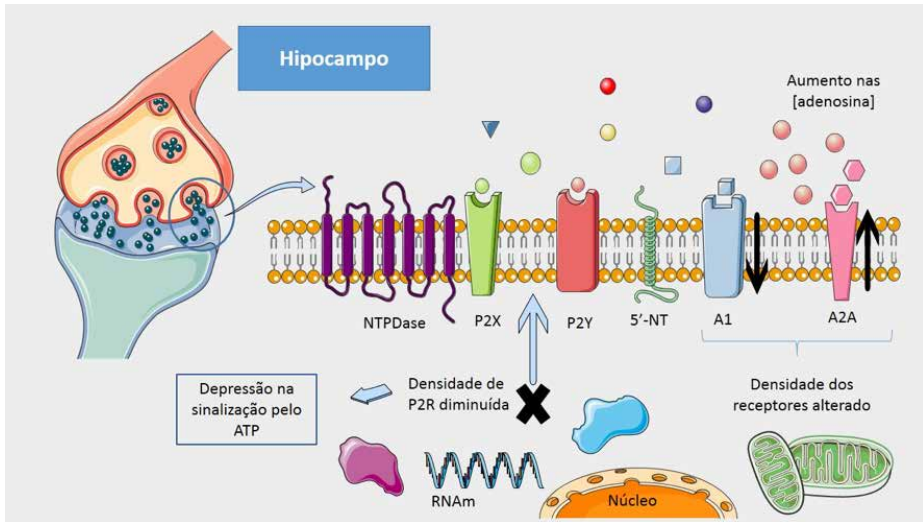
Figura 2: Liberação de IL-1β e TNF-α pela ativação do P2X7 pelo ATP na micróglia no córtex cerebral

Fonte: autoras (2019).

* No córtex cerebral, estudos têm demonstrado que a ativação do P2X7 pelo ATP na micróglia pode levar a liberação de IL-1β e TNF-α, os

quais poderiam contribuir com a morte de células gliais e neurônios caracterizando um dos mecanismos para a neurodegeneração.

Estudos com roedores demonstram uma elevada ativação do P2X7 em células de glia de um modelo de neuropatia diabética, assim como encontrado em córtex total de animais diabéticos (Liu *et al.*, 2017; Reichert *et al.*, 2018). Desta forma, o uso de antagonistas do receptor P2X7 pode ser um potencial agente terapêutico para doenças inflamatórias, como o diabetes.

Já a adenosina desempenha um papel regulatório da função neuronal, tendo como uma de suas principais características seu potente efeito neuromodulador no SNC, controlando a excitabilidade neuronal e liberação de neurotransmissores, além de ter controle sob a vasodilatação cerebral e fluxo sanguíneo em células corticais (Fredholm *et al.*, 2005). Assim como as outras moléculas sinalizadoras que compõem o sistema purinérgico, a adenosina age através de seus receptores. Destes, o receptor inibitório do sub-tipo A1 é o mais abundante no SNC e está vinculado a ações neuroptotetoras (Abbracchio; Cattabeni, 1999). O receptor A2A é encontrado predominantemente no estriado, mas também está presente em córtex e hipocampo (Rosin *et al.*, 1998). Ao contrário do receptor A1, o receptor A2A está associado a situações crônicas de neurodegeneração, de forma que sua ativação favorece a perda de memória e declínio cognitivo (Rebola *et al.*, 2005). Alguns estudos mostram que o equilíbrio entre os receptores de adenosina inibitórios A1 e estimulatório A2A é modificado no hipocampo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (Duarte *et al.*, 2006). Duarte e colaboradores sugerem que o mecanismo pelo qual o diabetes induzido por estreptozotocina conduz à modificação observada da densidade dos receptores de adenosina hipocampais ainda são incertos, mas que em outras doenças cerebrais crônicas, a down-regulação em longo prazo dos receptores A1 seria consequência de sua ativação prolongada pela adenosina endógena, que está aumentada nessas condições. A ativação prolongada dos receptores A1 levaria à sua regulação negativa, contudo, ainda não é claro se a indução de diabetes porestreptozotocina aumenta os níveis extracelulares de adenosina no hipocampo (Figura 3).

Figura 3: Depressão na sinalização do ATP pela densidade diminuída de P2X e P2Y

Fonte: autoras (2019).

- Estudos em hipocampo de ratos diabéticos tem demonstrado que receptores P2X e P2Y encontram-se com sua densidade diminuída podendo levar a depressão na sinalização do ATP. Ainda, receptores A1 poderiam ter sua densidade diminuída enquanto receptores A2A, aumentada. Esses efeitos poderiam ser consequência de um aumento nas concentrações de adenosina.

Por sua vez, Stefanello e colaboradores (2016) têm demonstrado que em córtex cerebral não há alterações nos níveis de adenosina (Stefanello *et al.*, 2016). Mais estudos estão sendo realizados com o intuito de desvendar as alterações no sistema nervoso central provocados pela hiperglicemia na condição diabética.

Plaquetas

A parede vascular e as células circulantes são bastante alteradas pela hiperglicemia. As plaquetas são fragmentos celulares derivados do megacariócito

e possuem tempo de vida médio em torno de sete a dez dias na corrente sanguínea (Kim *et al.*, 2013). Quando ativadas, liberam grânulos contendo em seu interior moléculas sinalizadoras que contribuem para a coagulação sanguínea, tais como ATP, ADP, tromboxanos, prostaglandinas, serotonina, glutamato e interleucinas (Shi; Morrell, 2011). As plaquetas de pacientes diabéticos são caracterizadas pela desregulação de várias vias de sinalização e tem sido sugerido que elas são hiper-reativas, mostrando aumento da adesão, ativação e agregação (Kim *et al.*, 2013). A hiper-reatividade das plaquetas não está totalmente elucidada, mas pode estar associada à redução na fluidez das membranas (Raffaelli *et al.*, 2015), alteração na homeostase dos íons cálcio e magnésio (Kim *et al.*, 2013), glicação de proteínas na superfície da membrana (Zhu *et al.*, 2012), aumento da adesão e ativação plaquetária, bem como também com o aumento no volume das plaquetas (Gasparyan *et al.*, 2011) e níveis de radicais livres e diminuição nas defesas antioxidantes (Raffaelli *et al.*, 2015). Dessa forma, o diabetes tem sido associado com o desenvolvimento de trombos e, consequentemente, com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Gremmel *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013).

As plaquetas expressam os subtipos de receptores P2Y1, P2Y12, P2X1 e P1 envolvidos na agregação plaquetária e na mudança de forma (Burnstock, 2017). As plaquetas mostraram conter altas concentrações de ATP que quando liberado no meio extracelular é rapidamente decomposto em ADP pelas ectonucleotidases presentes na membrana das plaquetas e nas células endoteliais. É conhecido que o ADP é um agonista da agregação plaquetária, já o ATP pode atuar como uma molécula agregante, mas é dependente de suas concentrações (Soslau; Youngprapakorn, 1997).

O controle das concentrações desses nucleotídeos é realizado pelas ectonucleotidases presentes nas plaquetas e vasos sanguíneos. É descrito por Schetinger *et al.* (2008) que as diferenças catalíticas entre NTPDase1 e NTPDase2 estão associadas a diferenças na capacidade de regular a função plaquetária (M. *et al.*, 2010). Essa afirmação está baseada no estudo realizado por pesquisadores canadenses: a NTPDase1 pode anular a agregação plaquetária, enquanto a expressão da NTPDase2 provavelmente promove a formação de microtrombosplaquetários em locais de extravasamento após lesão do vaso (Sévigny *et al.*, 2002).

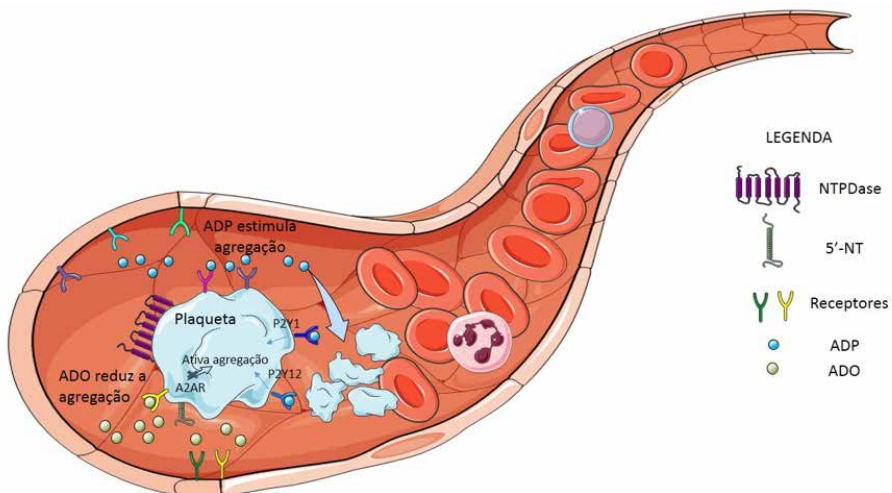
Por sua vez, os receptores purinérgicos estão envolvidos a partir do momento em que esses nucleotídeos possam ligar-se. O receptor P2Y1 inicia a agregação plaquetária, mas não é suficiente para uma agregação plaquetária completa em resposta ao ADP, enquanto o receptor P2Y12 é responsável pela conclusão da agregação estimulada pelo ADP. O P2Y12 é o alvo molecular das drogas antitrombóticas clopidogrel, prasugrel e ticagrelor. E é responsável pela maioria dos efeitos potenciadores do ADP quando as plaquetas são estimuladas por agentes como trombina, colágeno ou complexos imunes. Por sua vez, o receptor P2X1 está envolvido na alteração da forma das plaquetas e na ativação por colágeno sob condições de cisalhamento (Hechler; Gachet, 2011).

A hiperglicemia não tratada leva a alterações macro e microvasculares. Disfunções no endotélio dos vasos sanguíneos compreendem grande importância para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Sena *et al.*, 2013). A hiperglicemia é um dos principais fatores de risco para a disfunção endotelial, condição que é encontrada tanto em pacientes com DM tipo 1 quanto com DM tipo 2 (Lozano *et al.*, 2016). Além disso, a disfunção endotelial tem sido relacionada com o desenvolvimento de aterosclerose e trombose, estando também ligada ao aumento da agregação das plaquetas no diabetes (Ishida *et al.*, 2014; Sena *et al.*, 2013).

Estudos demonstram um aumento na agregação de plaquetas de ratos diabéticos através de ensaios envolvendo a agregação estimulada por diferentes concentrações de ADP em plaquetas provenientes de ratos diabéticos (Stefanello *et al.*, 2016). Além disso, mudanças na adesividadeplaquetária e reatividade foram encontradas em pacientes diabéticos, bem como um aumento na hidrólise de nucleotídeos pelas enzimas ectonucleotidases em plaquetas desses mesmos pacientes (Lunkes *et al.*, 2003). A insulina também é uma importante molécula sinalizadora na inibição da ativação das plaquetas, sendo que uma das vias é sua inibição na supressão induzida pelo receptor P2Y12 na formação do AMPc, atuante na inibição da agregação plaquetária (Ferreira *et al.*, 2006). Uma vez que está diminuída ou as células são resistentes a ela, a insulina não pode exercer seus efeitos na inibição da agregação plaquetária, por isso tanto os animais quanto os pacientes diabéticos possuem maior agregação plaquetária.

A adenosina também apresenta um papel importante na função plaquetária, podendo serliberada de células da parede vascular e plaquetas noespaço extracelular como um produto de degradação do ATP. Ao se ligar com seus

receptores específicos (P1), este nucleosídeo estimula a adenilil ciclase acoplada à proteína G nas plaquetas e aumenta os níveis intracelulares de AMPc, inibindo a ativação plaquetária (Varani *et al.*, 1999). Os receptores do sub-tipo A2A são os mais predominantes nas plaquetas. Porém, alguns estudos recentes têm demonstrado uma expressão semelhante do receptor do sub-tipo A2B nestas células (Ledent *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2010), como mostra a próxima figura.

Figura 4: Plaquetas – fragmentos responsáveis pela agregação das plaquetas

Fonte: autoras (2019).

* No diabetes há um aumento na sinalização pelo P2Y1 e P2Y12 que estimulam a ativação e agregação das plaquetas. Contudo, o receptor A2A quando ativado pela adenosina atua bloqueando a estimulação da agregação plaquetária.

Pesquisas científicas apontam que em plaquetas humanas, o receptor A2A medeia um aumento nos níveis de AMPcDionisotti *et al.* (1996). Em experimentos in vitro, a agregação plaquetária induzida por colágeno foi inibida após o tratamento com um agonista deste receptor (Linden *et al.*, 2008). Esses

dados sugerem que o uso de agonistas para o A2A podem contribuir nos casos clínicos, quando a inibição da função plaquetária se faz necessária.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema purinérgico, amplamente presente em diferentes tecidos por todo o corpo, está envolvido em uma gama de efeitos, contribuindo para o bom funcionamento desses tecidos, de modo que, em diversas doenças, componentes do sistema purinérgico são encontrados alterados, principalmente no diabetes. Diversos antagonistas e agonistas foram ou estão sendo estudados na tentativa de que regulando esses componentes alterados, podemos conseguir controlar os sintomas observados no diabetes. Contudo, pelo mesmo fato que torna o sistema purinérgico tão importante – estar em muitos tecidos – leva também a existência de muitos efeitos colaterais. O principal objetivo é desenvolver novos compostos que sejam tecido-específicos na tentativa de poder agir localmente minimizando os efeitos colaterais, mas mantendo efeitos que beneficiariam esses pacientes.

REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO, M. P.; CATTABENI, F. Brain adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases. Annals of the New York Academy of Sciences. v. 890, p. 79-92, 1999.

ANDERSON, C. M.; NEDERGAARD, M. Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. Trends in Neurosciences, 2006.

ANDERSSON, O.; ADAMS, B. A.; YOO, D. *et al.* Adenosine signaling promotes regeneration of pancreatic β cells in vivo. Cell Metabolism, 2012.

ANTONIOLI, L.; BLANDIZZI, C.; CSÓKA, B.; PACHER, P.; HASKÓ, G. Adenosine signalling in diabetes mellitus-pathophysiology and therapeutic considerations. Nature Reviews Endocrinology, 2015.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet. v. 358, p. 221-229, 2001.

BARONA, J.; JONES, J. J.; KOPEC, R. E. *et al.* A Mediterranean-style low-glycemic-load diet increases plasma carotenoids and decreases LDL oxidation in women with metabolic syndrome. Journal of Nutritional Biochemistry, 2012.

BAYNEST, H. W. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Journal of Diabetes & Metabolism, 2015.

BAZ, B.; RIVELINE, J. P.; GAUTIER, J. F. Gestational diabetes mellitus: Definition, aetiological and clinical aspects. European Journal of Endocrinology, 2016.

BIESSELS, G. J.; BRAUN, K. P. J.; DE GRAAF, R. A. *et al.* Cerebral metabolism in streptozotocin-diabetic rats: An in vivo magnetic resonance spectroscopy study. Diabetologia, v. 44, p. 346-353, 2001.

BIESSELS, G. J.; VAN DER HEIDE, L. P.; KAMAL, A.; BLEYS, R. L. A. W.; GISPEN, W. H. Ageing and diabetes: Implications for brain function. European Journal of Pharmacology, 2002.

BONDY, C. A.; CHENG, C. M. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. European Journal of Pharmacology, v. 490, p. 25–31, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de Atenção Básica Diabetes Mellitus. 2006.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Pathophysiology and therapeutic potential. Keio Journal of Medicine, 2013.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. Circulation Research, 2017.

BURNSTOCK, G.; EVANS, L. C.; BAILEY, M. A. Purinergic signalling in the kidney in health and disease. Purinergic Signalling, 2014.

BURNSTOCK, G.; NOVAK, I. Purinergic signalling and diabetes. Purinergic Signalling, 2013.

BURNSTOCK, G.; VAUGHN, B.; ROBSON, S. C. Purinergic signalling in the liver in health and disease. Purinergic Signalling, 2014.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Receptors for Purines and Pyrimidines. Purinergic Signalling and the Nervous System, 2012.

CASELLA, S.; BIELLI, A.; MAURIELLO, A.; ORLANDI, A. Molecular pathways regulating macrovascular pathology and vascular smooth muscle cells phenotype in type 2 diabetes. International Journal of Molecular Sciences, 2015.

CHETYRKIN, S.; MATHIS, M.; PEDCHENKO, V. *et al.* Glucose autoxidation induces functional damage to proteins via modification of critical arginine residues. Biochemistry, 2011.

CHIA, J. S. J.; MCRAE, J. L.; THOMAS, H. E. *et al.* The protective effects of CD39 overexpression in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. Diabetes, 2013.

CHIU, S. L.; CHEN, C. M.; CLINE, H. T. Insulin Receptor Signaling Regulates Synapse Number, Dendritic Plasticity, and Circuit Function In Vivo. Neuron, v. 58, p. 708–719, 2008.

CIEŚLAK, M.; ROSZEK, K. Purinergic signaling in the pancreas and the therapeutic potential of ecto-nucleotidases in diabetes. Acta Biochimica Polonica, 2014.

Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care, 2017.

COLEMAN, E.; JUDD, R.; HOE, L.; DENNIS, J.; POSNER, P. Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. GLIA, 2004.

COUTINHO-SILVA, R.; ROBSON, T.; BEALES, P. E.; BURNSTOCK, G. Changes in expression of P2X7 receptors in NOD mouse pancreas during the development of diabetes. Autoimmunity, v. 40, n. March, p. 108-116, 2007.

DELEKATE, A.; FÜCHTEMEIER, M.; SCHUMACHER, T. *et al.* Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. Nature Communications, 2014.

DIONISOTTI, S.; FERRARA, S.; MOLTA, C.; ZOCCHI, C.; ONGINI, E. Labeling of A2A adenosine receptors in human platelets by use of the new nonxanthine antagonist radioligand [3H] SCH 58261. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 278, p. 1209-14, 1996.

DUARTE, J. M. N.; OLIVEIRA, C. R.; AMBRÓSIO, A. F.; CUNHA, R. A. Modification of adenosine A1 and A2A receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. Neurochemistry International, v. 48, p. 144-150, 2006.

DUARTE, J. M. N.; OSES, J. P.; RODRIGUES, R. J.; CUNHA, R. A. Modification of purinergic signaling in the hippoCampus of streptozotocin-induced diabetic rats. Neuroscience, v. 149, p. 382-391, 2007.

EDLUND, H. Developmental biology of the pancreas. Diabetes, 2001.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic Signaling during Inflammation. New England Journal of Medicine, 2012.

FERREIRA, I. A.; MOCKING, A. I. M.; FEIJGE, M. A. H. *et al.* Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006.

FREDHOLM, B. B.; CHEN, J. F.; CUNHA, R. A.; SVENNINGSSON, P.; VAUGEOIS, J. M. Adenosine and Brain Function. International Review of Neurobiology, 2005.

GANNON, M. Molecular genetic analysis of diabetes in mice. Trends in Genetics, 2001.

GASPARYAN, A. Y.; AYVAZYAN, L.; MIKHAILIDIS, D. P.; KITAS, G. D. Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation? Current pharmaceutical design, 2011.

GENUTH, S.; SUN, W.; CLEARY, P. *et al.* Skin advanced glycation end products glucosepane and methylglyoxal hydroimidazolone are independently associated with long-Term microvascular complication progression of type 1 diabetes. Diabetes, 2015.

GOLD, M.; EL KHOURY, J. β-amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. Seminars in Immunopathology, 2015.

GRAY, S. P.; DI MARCO, E.; OKABE, J. *et al.* NADPH Oxidase 1 plays a key role in diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. Circulation, 2013.

GREMMEL, T.; FRELINGER, A. L.; MICHELSON, A. D. Platelet physiology. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2016.

HARDIKAR, A. A.; KARANDIKAR, M. S.; BHONDE, R. R. Effect of partial pancreatectomy on diabetic status in BALB/c mice. Journal of Endocrinology, 1999.

HARRIS, J. J.; JOLIVET, R.; ATTWELL, D. Synaptic Energy Use and Supply. Neuron, 2012.

HECHLER, B.; GACHET, C. P2 receptors and platelet function. Purinergic Signalling, 2011.

HECHLER, B.; GACHET, C. Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2015.

HUNT, J. V; DEAN, R. T.; WOLFF, S. P. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. Biochemical Journal, 2015.

IDZKO, M.; FERRARI, D.; RIEGEL, A. K.; ELTZSCHIG, H. K. Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. Blood, 2014.

ISHIDA, K.; TAGUCHI, K.; MATSUMOTO, T.; KOBAYASHI, T. Activated platelets from diabetic rats cause endothelial dysfunction by decreasing Akt/endothelial NO synthase signaling pathway. PLoS ONE, 2014.

JACQUES-SILVA, M. C.; CORREA-MEDINA, M.; CABRERA, O. *et al.* ATP-gated P2X3 receptors constitute a positive autocrine signal for insulin release in the human pancreatic cell. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010.

JOHANSSON, S. M.; SALEHI, A.; SANDSTRÖM, M. E. *et al.* A1 receptor deficiency causes increased insulin and

glucagon secretion in mice. Biochemical Pharmacology, 2007.

KAPOGIANNIS, D.; MATTSON, M. P. Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. The Lancet Neurology, 2011.

KARANAUSKAITE, J.; HOPPA, M. B.; BRAUN, M.; GALVANOVSKIS, J.; RORSMAN, P. Quantal ATP release in rat β-cells by exocytosis of insulin-containing LDCVs. Pflugers Archiv European Journal of Physiology, 2009.

KHEMKA, V. K.; BAGCHI, D.; GHOSH, A. *et al.* Raised Serum Adenosine Deaminase Level in Nonobese Type 2 Diabetes Mellitus. The Scientific World Journal, 2013.

KIM, J. H.; BAE, H. Y.; KIM, S. Y. Clinical marker of platelet hyperreactivity in diabetes mellitus. Diabetes and Metabolism Journal, 2013.

KING, A.; BOWE, J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. Biochemical Pharmacology, 2016.

KOUPENOVA, M.; RAVID, K. Adenosine, Adenosine Receptors and Their Role in Glucose Homeostasis and Lipid Metabolism. Journal of Cellular Physiology, 2013.

KURTUL, N.; PENCE, S.; AKARSU, E. *et al.* Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. Acta medica (Hradec Kralove), 2004.

LAVOIE, E. G.; FAUSTHER, M.; KAUFFENSTEIN, G. *et al.* Identification of the ectonucleotidases expressed in mouse, rat, and human Langerhans islets: Potential role of NTPDase3 in insulin secretion. American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism, 2010.

LEDENT, C.; VAUGEOIST, J. M.; SCHIFFMANN, S. N. *et al.* Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A(2a) receptor. Nature, v. 388, p. 674-678, 1997.

LIGTHART, S.; VAN HERPT, T. T. W.; LEENING, M. J. G. *et al.* Lifetime risk of developing impaired glucose metabolism and eventual progression from prediabetes to type 2 diabetes: A prospective cohort study. The Lancet Diabetes and Endocrinology, 2016.

LINDEN M. D.; BARNARD M. R.; FRELINGER A. L.; MICHELSON A. D. Effect of adenosine a2 receptor stimulation on platelet activation-aggregation: differences between canine and human models. Thromb. Res., v. 121, p. 689-698, 2008.

LIU, J.; MAO, J.; JIANG, Y. *et al.* AGEs Induce Apoptosis in Rat Osteoblast Cells by Activating the Caspase-3 Signaling Pathway Under a High-Glucose Environment In Vitro. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016.

LIU, W.; AO, Q.; GUO, Q. *et al.* miR-9 Mediates CALHM1-Activated ATP-P2X7R Signal in Painful Diabetic Neuropathy Rats. Molecular Neurobiology, v. 54, p. 922–929, 2017.

LOZANO, I.; VAN DER WERF, R.; BIETIGER, W. *et al.* High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: Impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. Nutrition and Metabolism, 2016.

LUCHSINGER, J. A. Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease. An epidemiological perspective. European Journal of Pharmacology, 2008.

LUNKES, G. I. L.; LUNKES, D. S.; MORSCH, V. M.; *et al.* NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. Diabetes Research and Clinical Practice, 2004.

LUNKES, G. I.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; *et al.* Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. Thrombosis Research, v. 109, p. 189-194, 2003.

M., S.; P., M.; V., M. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. Purinergic Signalling, v. 6, p. S27, 2010.

MIJNHOUT, G. S.; SCHELTENS, P.; DIAMANT, M. *et al.* Diabetic encephalopathy: A concept in need of a definition [1]. Diabetologia, 2006.

NELSON, P. T.; SMITH, C. D.; ABNER, E. A. *et al.* Human cerebral neuropathology of Type 2 diabetes mellitus. Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease, 2009.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X. L. *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature, 2000.

NOVAK, I. Purinergic receptors in the endocrine and exocrine pancreas. Purinergic Signalling, 2008.

OKIZAKI, S. ICHIRO; ITO, Y.; HOSONO, K. *et al.* Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF-β1 and impairs wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2015.

RAFFAELLI, F.; NANETTI, L.; MONTECCHIANI, G. *et al.* Invitro effects of fermented papaya (Carica papaya, L.) on platelets obtained from patients with type 2 diabetes. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2015.

RAHIMI, R.; NIKFAR, S.; LARIJANI, B.; ABDOLLAHI, M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie, v. 59, n. 7, p. 365–73, 2005.

REBOLA, N.; RODRIGUES, R. J.; LOPES, L. V. *et al.* Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippoCampus. Neuroscience, v. 133, p. 79-83, 2005.

REICHERT, K. P.; SCHETINGER, M. R. C.; GUTIERRES, J. M. *et al.* Lingonberry Extract Provides Neuroprotection by Regulating the Purinergic System and Reducing Oxidative Stress in Diabetic Rats. Molecular Nutrition and Food Research, v. 62, 2018.

ROBERTS-TOLER, C.; O'NEILL, B. T.; CYPESS, A. M. Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. Obesity, 2015.

ROCKETTE-WAGNER, B.; EDELSTEIN, S.; VENDITTI, E. M. *et al.* The impact of lifestyle intervention on

sedentary time in individuals at high risk of diabetes. Diabetologia, 2015.

ROSIN, D. L.; ROBEVA, A.; WOODARD, R. L.; GUYENET, P. G.; LINDEN, J. Immunohistochemical localization of adenosine A(2A) receptors in the rat central nervous system. Journal of Comparative Neurology, v. 401, p. 163-186, 1998.

RÜSING, D.; MÜLLER, C. E.; VERSPOHL, E. J. The impact of adenosine and A 2B receptors on glucose homoeostasis . Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2006.

SANTINI, E.; CUCCATO, S.; MADEC, S. *et al.* Extracellular adenosine 5′-triphosphate modulates insulin secretion via functionally active purinergic receptors of X and Y subtype. Endocrinology, 2009.

SCHMATZ, R.; MANN, T. R.; SPANEVELLO, R. *et al.* Moderate Red Wine and Grape Juice Consumption Modulates the Hydrolysis of the Adenine Nucleotides and Decreases Platelet Aggregation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Cell Biochemistry and Biophysics, v. 65, n. 2, p. 129-143, 2013.

SCHMATZ, R.; SCHETINGER, M. R. C.; SPANEVELLO, R. M. *et al.* Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sciences, v. 84, n. 11-12, p. 345-350, 2009.

SCHNEDL, W. J.; FERBER, S.; JOHNSON, J. H.; NEWGARD, C. B. STZ transport and cytotoxicity: Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. Diabetes, 1994.

SCHOBER, E.; RAMI, B.; GRABERT, M.; *et al.* Phenotypical aspects of maturity-onset diabetes of the young (MODY diabetes) in comparison with Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents: Experience from a large multicentre database. Diabetic Medicine, 2009.

SCHULINGKAMP, R. J.; PAGANO, T. C.; HUNG, D.; RAFFA, R. B. Insulin receptors and insulin action in the brain: Review and clinical implications. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2000.

SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction – A major mediator of diabetic vascular disease. Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease, 2013.

SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; BRAUN, N. *et al.* Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. Blood, 2002.

SHEETZ, M. J.; KING, G. L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. Journal of the American Medical Association, 2002.

SHI, G.; MORRELL, C. N. Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall. Thrombosis Research, 2011.

SOLINI, A.; CUCCATO, S.; FERRARI, D. *et al.* Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: A new potential marker

of the disease? Endocrinology, v. 149, p. 389-396, 2008.

SOLINI, A.; USUELLI, V.; FIORINA, P. The Dark Side of Extracellular ATP in Kidney Diseases. Journal of the American Society of Nephrology, 2014.

SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKORN, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research, 1997.

SRINIVASAN, K.; VISWANAD, B.; ASRAT, L.; KAUL, C. L.; RAMARAO, P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. Pharmacological Research, 2005.

STEFANELLO, N.; SCHMATZ, R.; PEREIRA, L. B. *et al.* Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. Molecular and Cellular Biochemistry, v. 388, n. 1-2, p. 277-286, 2014.

STEFANELLO, N.; SCHMATZ, R.; PEREIRA, L. B. *et al.* Effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on components of the purinergic system of streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Nutritional Biochemistry, v. 38, p. 145-153, 2016.

TANG, J.; PUGH, W.; POLONSKY, K. S.; ZHANG, H. Preservation of insulin secretory responses to P2 purinoceptor agonists in Zucker diabetic fatty rats. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2017.

TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2012.

TRUDEAU, F.; GAGNON, S.; MASSICOTTE, G. Hippocampal synaptic plasticity and glutamate receptor regulation: Influences of diabetes mellitus. European Journal of Pharmacology, 2004.

VARANI, K.; PORTALUPPI, F.; MERIGHI, S. *et al.* Caffeine alters A(2A) adenosine receptors and their function in human platelets. Circulation, v. 99, p. 2499-2502, 1999.

VIEIRA, F. S.; NANINI, H. F.; TAKIYA, C. M.; COUTINHO-SILVA, R. P2X7 receptor knockout prevents streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 419, p. 148-157, 2016.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, 2015.

WADA, J.; MAKINO, H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. Clinical Science, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-DEPARTMENT OF NONCOMUNICABLE DISEASE SURVEILLANCE GENEVA. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. 1999.

WU-ZHANG, A. X.; NEWTON, A. C. Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. Biochemical Journal, 2013.

YANG, D.; CHEN, H.; KOUPENOVA, M. *et al.* A new role for the A2b adenosine

receptor in regulating platelet function. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 8, p. 817-827, 2010.

ZHAO, W. Q.; ALKON, D. L. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 177, p. 125-134, 2001.

ZHAO, Y.; YE, W.; BOYE, K. S. *et al.* Prevalence of other diabetes-associated complications and comorbidities and its impact on health care charges among patients with diabetic neuropathy. Journal of Diabetes and its Complications, 2010.

ZHENG, Y.; YANG, Y.; DONG, B.; *et al.* Metabonomic profiles delineate potential role of glutamate-glutamine cycle in db/db mice with diabetes-associated cognitive decline. Molecular Brain, 2016.

ZHU, K.; KAKEHI, T.; MATSUMOTO, M. *et al.* NADPH oxidase NOX1 is involved in activation of protein kinase C and premature senescence in early stage diabetic kidney. Free Radical Biology and Medicine, 2015.

ZHU, W.; LI, W.; SILVERSTEIN, R. L. Advanced glycation and products induce a prothrombotic phenotype in mice via interaction with platelet CD36. Blood, 2012.

A SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NO CONTEXTO DA FISIOPATOLOGIA DA TOXOPLASMOSE

Nathieli Bianchin Bottari

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços no conhecimento e na prática médica, as doenças parasitárias continuam a ser um relevante problema de saúde global e uma das causas mais importantes de morbidade em crianças e adultos imunocomprometidos. Entre as principais enfermidades de importância clínica, incluem-se as causadas por protozoários, dos quais se destaca o *Toxoplasma gondii*, um parasito cosmopolita que acomete tanto os seres humanos como os animais.

O *T. gondii* é um parasito com ampla distribuição geográfica e grande potencial zoonótico que ocasiona a doença toxoplasmose em humanos. Os principais eventos durante a infecção por *T. gondii* incluem a entrada do microrganismo, invasão e colonização dos tecidos do hospedeiro, evasão das respostas imunes e finalmente lesão tecidual.

Recentes desenvolvimentos na área da biologia molecular forneceram ferramentas importantes para elucidar a sobrevivência e a replicação parasitária dentro da célula hospedeira, bem como as estratégias de resistência desenvolvidas pelo parasito a fim de perpetuar-se nas células. Estudos têm demonstrado a compreensão do papel desempenhado pela sinalização purinérgica contra inúmeros invasores intracelulares, incluindo o *T. gondii*, e como esta via de

sinalização poderá ser uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de novas estratégias contra esse patógeno.

As respostas imunes contra o *T. gondii* resultam na liberação ativa de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares pelas células danificadas, especialmente o nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP) e o nucleosídeo correspondente a adenosina, que culminam em respostas celulares com características únicas, ativando ou inibindo receptores purinérgicos. Dessa forma, neste capítulo, faremos uma breve discussão sobre a sinalização purinérgica no contexto da patogênese da toxoplasmose e como este sistema orquestra respostas imunológicas e funções celulares efetoras no combate à infecção pelo parasita *T. gondii*.

Etiologia da toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário onipresente que integra um dos grupos mais importantes do filo Apicomplexa e é o agente etiológico da toxoplasmose, uma doença clínica que afeta em torno de 30% da população mundial (Montoya; Lisenfeld, 2004; Dubey, 2012 a,b).

A infecção causada pelo parasito *T. gondii* constitui atualmente uma das zoonoses mais difundidas no mundo, uma vez que um terço da população mundial, aproximadamente, é soropositivo para toxoplasmose (Sibley, 2003). Apesar de o *T. gondii* infectar cronicamente os seres humanos, a prevalência da infecção está diretamente relacionada a fatores como exposição ambiental, hábitos alimentares, predisposição genética e clima tropical (Mack *et al.*, 1999).

A toxoplasmose pode ser transmitida ao homem, que é considerado o hospedeiro definitivo no ciclo biológico do parasito, por diferentes meios de transmissão, os quais incluem: ingestão de oocistos lançadas no meio ambiente através das fezes de gatos; ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas; transmissão vertical, em que as formas infeciosas do *T. gondii*, chamadas de taquizóitos, são transferidas para o feto via transplacentária ou leite materno; forma acidental através de transplante de sangue ou órgãos (Hill; Dubey, 2002).

A maioria das infecções em adultos não ocasiona complicações graves e são geralmente assintomáticas. Por outro lado, em pacientes imunossuprimidos, tais como HIV positivos, pacientes com câncer ou sob uso de imunossupressores a

toxoplasmose, apresenta-se de forma aguda, podendo ocasionar, em alguns casos, a encefalite toxoplasmica ou evoluir para uma fase crônica da doença, com quadros como a toxoplasmose ocular e a neurotoxoplasmose, que provoca lesões necróticas no bulbo olfatório e cérebro respectivamente (Wang *et al.*, 2017).

Outra população de risco são as gestantes. Na toxoplasmose congênita, que pode ocorrer quando a mãe adquire a infecção durante a gravidez, a parasitemia induz a placentite seguida por propagação de taquizoítos para o feto, caracterizando a transmissão vertical (Montoya; Remington, 2008). As crianças infectadas pelo *T. gondii* podem desenvolver quadros de microcefalia, hidrocefalia, calcificação intracranial e coriorretinite, além de retardo mental e em alguns casos psicomotor (Remington *et al.*, 2005).

Patogenia da infecção

A capacidade de infecção e disseminação do *T. gondii* deve-se às características exclusivas deste parasito. A primeira característica que diferencia o *T. gondii* dos demais protozoários é a capacidade de infectar qualquer tipo de célula nucleada. Isto é, com exceção das hemácias, todas as células do organismo tornam-se alvos do parasita (Barragan; Sibley, 2003). Essa habilidade garante, ainda, uma ampla diversidade de propagação, já que, além de humanos, outros mamíferos, como cães, gatos, golfinhos, e até mesmo aves podem adquirir a toxoplasmose (Dubey, 2012a).

O segundo fator que contribui para a propagação da infecção pelo *T. gondii* é que este protozoário pertence ao filo Apicomplexa, tornando-o um parasita intracelular obrigatório (agem igual aos vírus) com capacidade de ocasionar doenças graves em humanos, assim como outros protozoários que fazem parte deste filo, a exemplo do *Plasmodium*, causador da Doença de Chagas e do *Cryptosporidium* agente etiológico da criptosporidíase, uma doença que causa diarreia severa em humanos (Weiss; Kim, 2007).

Diferentemente das bactérias, vírus e outros parasitas que dependem do hospedeiro para infectar as células, o *T. gondii* não depende de processos mediados pelo hospedeiro. Em vez disso, ele desliza entre os espaços intra e extracelulares para navegar pelo ambiente, atravessar as barreiras teciduais e penetrar nas células hospedeiras (Barragan; Sibley, 2002). A natureza conservada da

mobilidade de deslizamento deste parasita atesta a sua eficiência em promover uma existência intracelular. Embora aparentemente complicadas, as ações coordenadas de secreção, translocação e liberação seletiva de moléculas adesivas permitem ao parasita a fixação e migração ativamente nos tecidos.

Desse modo, o *T. gondii* transita por diversos tecidos e órgãos, tais como o fígado, os rins, o cérebro, os pulmões, as musculaturas esquelética e cardíaca (Dubey, 2012a). No entanto, o *T. gondii* tem tropismo por tecidos altamente vascularizados, como o sistema nervoso central (SNC). Neste local, o *T. gondii* se diferencia em uma forma infecciosa dormente, os chamados cistos teciduais, estabelecendo uma infecção crônica vitalícia (Sullivan *et al.*, 2012).

Estudos demonstram que o *T. gondii* utiliza as células imunes inatas (macrófagos e células dendríticas) como verdadeiros "veículos de transporte", a fim de migrar para locais imunologicamente privilegiados, como o ambiente protegido do SNC, constituindo uma infecção latente (Hitziger *et al.*, 2005).

O parasita *T. gondii* sobrevive dentro das células hospedeiras superando diversos mecanismos antimicrobianos naturais, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (ON), fusão do lisossoma (ao vacúolo parasitóforo), indução da morte da célula hospedeira e secreção de citosinas pró-inflamatórias (Denkers *et al.*, 2003). Concomitantemente, o *T. gondii* desencadeia a ativação de fatores de transcrição e vias de sinalização anti-inflamatórias na célula hospedeira, induzindo a super expressão de receptores envolvidos na migração, ativação e regulação efetora das células imunes. Esse delicado equilíbrio entre a sobrevivência do parasita e a homeostase celular do hospedeiro é mediado por moduladores da imunidade e evitam danos teciduais excessivos.

Evasão do parasita à resposta imune

Apesar da capacidade do *T. gondii* em subverter os mecanismos do sistema imunológico e disseminar-se rapidamente nos tecidos estabelecendo a fase latente da infecção (crônica), a persistência do *T. gondii* nos tecidos, por outro lado, compromete diretamente o tratamento da toxoplasmose, já que o alcance farmacológico e as respostas imunes em tecidos imunologicamente protegidos são mais complexos (Lambert; Barragan, 2010).

O primeiro mecanismo de escape do *T. gondii* envolve um processo que modifica o conteúdo das vesículas fagocíticas, tornando as membranas das células fagocíticas mais permeáveis. Assim, o *T. gondii* utiliza suprimentos de nutrientes que podem ser encontrados nas vias endocíticas ou exocíticas da célula hospedeira, como o nucleosídeo adenosina (Mahamed, 2012 ab). O mecanismo molecular por trás dessa modificação não está bem estabelecido; no entanto, o parasita secreta um grande número de proteínas roptrias (ROP) e uma segunda classe de organelas secretoras chamadas de grânulos densos, muitos dos quais são direcionados para a membrana do vacúolo fagocítico (Długońska, 2004). Como essas proteínas se juntam para aumentar a permeabilidade permanece um assunto incerto.

Após a entrada ativa do *T. gondii* nas células hospedeiras, os *taquizóitos* permanecem dentro do vacúolo parasitóforo e escapam da morte pelas células do sistema imune inibindo a fusão de organelas ácidas. Essa é outra estratégia de resistência utilizada pelo *T. gondii* e inclui a inibição da fusão do fagolisossomo o que impede a acidificação do vacúolo parasitóforo e o ataque das enzimas lisossômicas proteolíticas (Mordue, 1997; Ding *et al.*, 2004; Akerman; Muller, 2005).

O *T. gondii* também modula a produção de EROs da célula hospedeira e mediadores inflamatórios envolvidos no controle da infecção. Isso só é possível, porque o *T. gondii* expressa enzimas antioxidantes, incluindo catalases e peroxidases, para se proteger contra a atividade das EROs liberadas pelas células do hospedeiro (Ding *et al.*, 2004; Akerman; Muller, 2005).

Enquanto a produção de EROs contribui para a eliminação do patógeno, destruindo as estruturas do parasita por oxidação, este efeito é potencializado pela formação de ON (Flannagan *et al.*, 2009). O ON é um importante mediador da resistência à infecção por *T. gondii* nas respostas inatas e adaptativas, produzidas principalmente por fagócitos ativados, os quais controlam a replicação e diferenciação dos taquizoítos em bradizoítas císticos e o estabelecimento da doença crônica (Denkers, 2003).

Por fim, a sinalização de cálcio também é uma importante válvula de escape para *T. gondii*, uma vez que o parasita requer mobilização de cálcio (Ca^{2+}) para a invasão e saída nas células hospedeiras, estabelecimento nos vacúolos parasitóforos e também recrutamento de organelas. Dessa forma, a interferência

na sinalização de Ca^{2+} pode prevenir a invasão do parasita nas células hospedeiras (Caldas *et al.*, 2007).

A resposta imune desencadeada na infecção primária pelo *T. gondii* é sinalizada através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*), moléculas essenciais para microrganismos e tipicamente não expressas pelas células hospedeiras (Kopp; Medzhitov, 2003). Os PAMPs são reconhecidos por receptores TLRs (TLR, do inglês *Toll-like Receptors*) presentes nos macrófagos, células dendríticas e células endoteliais. No caso do *T. gondii*, é o TLR11 que reconhece e controla a sinalização de eventos intracelulares (Plattner *et al.*, 2008). Além do TLR11, estudos demonstram que outros TLRs, especialmente TLR2 e TLR4, podem ser ativados em resposta contra o parasita (Debierre-Grockiego *et al.*, 2007). Ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que animais deficientes (nocaute, do inglês *knockout*) para o TLR11 expressam níveis de interleucina 12 (IL-12) reduzidos, o que diminui as respostas imunológicas contra o *T. gondii* e torna as células extremamente vulneráveis à infecção (Yarovinsky, 2008). Embora experimentos *in vitro* tenham revelado que o *T. gondii* ativa TLR2 e TLR4, a deficiência de receptores TLR2 ou TLR4 tem pouco ou nenhum efeito sobre a IL-12, mas parece estar envolvida na regulação do fator de necrose tumoral (TNF) e na produção de outras citosinas durante a toxoplasmose experimental (Sibley *et al.*, 1991).

Além dos TLRs, uma proteína adaptadora, a MyD88, estimula a transcrição nuclear de altos níveis de IL-12 e interferon gama (IFN-γ) pelas células do sistema imune inato. Estudos demonstraram que a ativação da MyD88 é essencial para a proteção contra o *T. gondii* e para a geração de respostas eficazes das células T. Por outro lado, a deficiência da MyD88 em camundongos *knockout* (MyD88-/-) impediu a liberação de citosinas pró-inflamatórias e os animais não conseguiram estabelecer uma forte resposta Th1 (Scanga *et al.*, 2002).

A resposta imune contra o parasita é determinada pela secreção de IL-12 e IFN-γ pelas células imunes inatas e adaptativas. A IL-12 desempenha um papel importante na regulação e na produção de IFN-γ pelas células assassinas naturais (NK, do inglês *natural killer*) e linfócitos T (Pifer; Yarovinsky, 2011). Ensaios experimentais demonstram que, na ausência de IL-12, os animais são mais suscetíveis ao *T. gondii*, e o bloqueio da IL-12 durante as fases aguda ou crônica resulta na replicação descontrolada do parasita (Gazzinelli *et al.*, 1993).

A identificação do IFN-γ como regulador importante da imunidade mediada por células para *T. gondii* foi uma descoberta chave que impulsionou para um enorme progresso na identificação dos principais mecanismos efetores e de reconhecimento para a resistência do hospedeiro contra o *T. gondii*. A falta de IFN-γ durante o início da resposta imune ao parasita ou o bloqueio do IFN-γ durante a fase crônica resulta em rápida mortalidade celular e maior susceptibilidade à infecção (Suzuki *et al.*, 1988).

Outras citosinas como a interleucina 1 beta (IL-1β) e a IL-18 são mediadores cruciais da inflamação durante a toxoplasmose, e um controle defeituoso de sua liberação pode evoluir para um dano celular grave. No entanto, os mecanismos que regulam a secreção de IL-1β e IL-18 são parcialmente indefinidos. Ambas as citosinas são produzidas durante a infecção como precursores citoplasmáticos inativos. O processamento para a forma ativa é mediado pela enzima caspase-1, que, por sua vez, é ativada pelo complexo multiproteico, o inflamassoma (Broz; Dixit, 2016).

Recentemente, estudos têm evidenciado que o reconhecimento de patógenos, como o *T. gondii* por monócitos, macrófagos e células dendríticas através dos TLRs, desencadeia eventos intracelulares que levam à indução da síntese da citosina pró-inflamatória pró-IL-1β e também estimulam a secreção de ATP, o qual, através do receptor purinérgico, estimula a ativação do inflamassoma (Piccini *et al.*, 2008). O inflamassoma NLRP3 é desencadeado por condições de estresse citosólico, como afluxo de K^+, vazamento de componentes do lisossomo, dano mitocondrial e produção de EROs (Yarovinsky *et al.*, 2008; He *et al.*, 2016).

Em testes que utilizaram macrófagos isolados de camundongos, foi possível comprovar que a ativação da sinalização purinérgica pelo ATP é estritamente necessária como um segundo sinal para o processamento e secreção da IL-1 em resposta a estímulos extracelulares (Correa *et al.*, 2010). A ativação do receptor P2X7 por ATP inibe o crescimento de *T. gondii* em macrófagos e contribui para a eliminação do parasito pela produção de EROs e pela fusão do lisossomo com o vacúolo parasitóforo. Além disso, o ATP ativa o inflamassoma NLRP3, que aumenta a produção de IL-1β (via atividade da caspase-1), levando à geração de ROS mitocondrial como uma resposta pró-inflamatória antiparasitária Moreira-Souza *et al.*, 2017), o que se verifica na Figura 1.

A produção de EROs é um dos mecanismos microbicidas mais potentes contra patógenos intracelulares. Contudo, o *T. gondii* bloqueia eficientemente

a produção de EROs para sobreviver e escapar dos mecanismos imunes do hospedeiro (Ding *et al.*, 2004). Assim, estímulos que atuam em diferentes receptores de detecção de patógenos convergem em uma via comum, em que a externalização do ATP é o primeiro passo dentre inúmeros eventos intracelulares desencadeados pela sinalização purinérgica.

Como o ATP modula as respostas imunes e inflamatórias contra o *Toxoplasma gondii*?

Embora a resposta imune seja essencial para controlar a infecção induzida pelo *T. gondii*, a própria resposta imune pode, ao mesmo tempo, ser danosa e causar uma inflamação sistêmica grave levando ao dano tecidual e, por conseguinte, à apoptose. Algumas substâncias de alarme são liberadas em resposta ao tecido lesionado ou na presença do parasita, essas moléculas sinalizam sinais de perigo e são chamados de padrões moleculares associados ao dano (DAMPS, do inglês *Damage Associated Molecular Pattern*).

Nucleotídeos extracelulares, como a adenosina trifosfato (ATP), são conhecidos por funcionar como DAMPs, atuando na sinalização endógena de moléculas que contribuem para a inflamação e respostas imunológicas (Bours *et al.*, 2006; Coutinho-Silva *et al.*, 2012). Após o dano tecidual ou durante uma inflamação e/ou infecção, muitas células liberam ATP e outros nucleotídeos (Praetorius; Leipziger, 2009).

O ATP atua como um imunomediador pró-inflamatório em vários tipos de células imunológicas envolvidas na defesa contra parasitas, incluindo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Elliot *et al.*, 2009). Uma vez no espaço extracelular, o ATP comporta-se como uma substância de alarme, emitindo um "sinal de perigo", e é rapidamente hidrolisado pela enzima ectonucleosideo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, do inglês *ectonucleosideo trifosfato difosfohidrolase*), também conhecida por CD39, em monofosfato de adenosina (AMP). Em seguida, a ecto-5´-nucleotidase (E-5´-NT, CD73) converte o nucleotídeo AMP em adenosina (Yegutkin, 2008). Além da CD39 e CD73, que são as principais enzimas metabolizadoras de nucleotídeos que regulam a imunidade e inflamação, existem outras enzimas associadas à superfície celular envolvidas no catabolismo de nucleotídeos extracelulares, que incluem

fosfatases alcalinas, pirofosfatases e fosfodiesterases, bem como à ecto enzima adenilato-quinase (AK) regeneradoras de ATP e do nucleosídeo-difosfato quinase (Fredholm *et al.*, 2001; Deaglio; Coutinho-Silva, 2011).

Uma variedade de patógenos intra e extracelulares, como *Mycobacterium bovis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e *Vibrio cholera*, possuem uma sinalização purinérgica intrínseca e secretam uma gama de enzimas que metabolizam nucleotídeos, incluindo 5´-NT, AK e ecto-nucleosídeo difosfato quinases (Gounaris; Selkirk, 2005). Entretanto, o *T. gondii*, assim como outros parasitas do filo Apicomplexa, precisa de purinas do hospedeiro, como a adenosina para sintetizar a sua própria adenosina. Igualmente, o *T. gondii* secreta um nucleosídeo trifosfato/difosfato hidrolase (apirase) nos vacúolos endocíticos da célula hospedeira, porém enzimaticamente inativo. Assim, dois caminhos de utilização de purinas foram identificados em *T. gondii*, envolvendo as enzimas hipoxantina-xantina-guanina fosforibosiltransferase (HXGPRT) e AK. A atividade da AK parece ser dez vezes maior do que outras enzimas de resgate de purina, e a adenosina é a fonte preferida de purinas para *T. gondii*. Porém, estudos genômicos comparativos mais detalhados da via de resgate de purinas em várias espécies apicomplexas deverão desvendar rotas alternativas de salvamento de purinas (Krug *et al.*, 1989; Chaudhary *et al.*, 2004).

O receptor P2X7 interfere diretamente na morte do *Toxoplasma gondii*

O ATP pode ativar diretamente duas famílias de receptores de nucleotídeos ligados à membrana, denominados receptores P2. Os membros de ambas as famílias do P2, P2X e P2Y, modulam positivamente a imunidade contra o *T. gondii* pelo controle da migração de neutrófilos aos sítios de infecção, liberação de citosinas, e maturação das células dendriticas (Coutinho-Silva; Ojcius, 2012).

Durante a toxoplasmose, o receptor purinérgico P2X7 funciona como um receptor pró-inflamatório. A expressão do P2X7 na superfície da membrana celular é regulada pela secreção de IFN-γ liberado por macrófagos e células danificadas (Less *et al.*, 2010). A ativação do P2X7 em macrófagos demonstrou estar envolvido com a morte do parasita *T. gondii* (Figura 1) e possui fenômenos semelhante a outras espécies de parasitas intracelulares, como o

Mycobacterium, a *Clamidia*, o *Leishmania* e *Trypanossoma cruzi* (Lammas *et al.*, 1997; Coutinho-Silva *et al.*, 2001; Chaves *et al.*, 2009).

A ativação do receptor P2X7 pelo ATP extracelular durante a toxoplasmose abre um canal iônico específico para cátions que resulta no influxo de íons Ca^{2+} e sódio (Na^{+}) e no efluxo de potássio (K^{+}). A liberação prolongada de ATP pelas células do hospedeiro acaba criando um poro na membrana celular que aumenta ainda mais a concentração de Ca^{2+} intracelular, bem como permite a passagem de moléculas maiores. Essa alteração no ambiente iônico da célula desencadeia várias vias celulares. O mais proeminente na infecção por *T. gondii* é efluxo de K^{+}, o qual estimula a formação do inflamassoma, resultando na ativação da caspase-1.

Outras vias são ativadas pelo ATP como o efluxo de K^{+} e influxo de Na^{+} que ativam a via das proteínas quinases ativada por estresse (SAPK)/c-Jun N-terminal (JNK), resultando na indução de apoptose. O influxo de Ca^{2+} ativa também a fosfolipase D via RhoA, levando à fusão fagossomo/lisossomo e à morte de patógenos intracelulares. O influxo de Ca^{2+} também pode ativar a proteína quinase ativada por mitógeno p38, estimulando vários efeitos a jusante. A fosforilação da p38 leva à montagem da NADPH oxidase na membrana plasmática e à produção subseqüente de superóxido (O_{2-}), potencializa a ativação do fator nuclear kappa B (NFκB) via sinalização do receptor TLR e a subsequente transcrição da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e produção de ON, bem como produção de TNF e IL-6. Também pode levar à fosforilação da proteína de ligação dos elementos de resposta a AMPc (CREB) via cinase ativada por mitógeno e estresse (MSK1). A CREB fosforilada (CREB-P) seqüestra a proteína de ligação a CREB (CBP), um fator de co-transcrição necessário para a transcrição gênica mediada por NFκB, e inibe a transcrição de genes controlados por NFκB. A CREB/CBP fosforilada estimula a produção de genes responsivos a cAMP, tais como *Cebpb*, que actuam para modular a resposta inflamatória através da produção de arginase-1 (Arg-1) e IL-10 (Iller *et al.*, 2011).

Várias linhas de evidências em torno do P2X7 seja utilizando camundongos *knockout* para o receptor P2X7 ou a análise de polimorfismos genéticos sustentam a noção de que a atividade do receptor P2X7 é essencial no controle da infecção por *T. gondii*, desencadeando atividades antimicrobianas no ambiente intracelular (como produção de EROS e fusão do lisossomo com o

vacúolo parasitóforo) e estimulando eventos pró-inflamatórios, como a produção de IL-12, IL-1β e IFN-γ (Corrêa *et al.*, 2017), como mostra a Figura 1.

Além disso, polimorfismos pontuais no receptor humano P2X7 estão diretamente associados à suscetibilidade do hospedeiro em contrair à toxoplasmose congênita ou adquirida, em pacientes imunocompetentes. Além disso, a ausência do P2X7 ou a interrupção da função do receptor P2X7 aumenta a gravidade da infecção com cepas virulentas (RH, tipo I) ou não virulentas (Me-49, tipo II) de *T. gondii* (Jamieson *et al.*, 2010).

Enquanto o ligante natural para os receptores P2X é o ATP, os receptores P2Y são responsivos à ATP, UTP, ADP e UDP, com diferenças na preferência do ligante e afinidades dependendo o subtipo. Por lise celular, exocitose ou estresse mecânico induzido por hipóxia, esses nucleotídeos são liberados no meio extracelular, onde eles ativam os receptores da família P2Y por ligação ao seu domínio extracelular. O ADP é um potente agonista da agregação plaquetária, atuando através dos receptores purinérgicos P2Y1 e P2Y12. A agregação plaquetária leva à amplificação da resposta por meio da liberação secundária de ADP e liberação de mediadores inflamatórios incluindo o ATP. Assim, as ectonucleotidases atuam regulando negativamente várias respostas que afetam a homeostase, a inflamação e a dor. O produto final da reação, o AMP, é hidrolisado à adenosina pela ação da 5'-NT, o que se considera benéfico, pois a adenosina inibe a agregação plaquetária e tem atividade vasodilatadora, promovendo o fluxo sanguíneo.

Estudos envolvendo o receptor P2Y durante a infecção por *T. gondii* ainda são escassos na literatura. Entretanto, um estudo revelou que durante a infecção por *T. gondii* há uma ativação dos receptores P2Y quando estimulados pelos agonistas UTP e UDP. Dentre os receptores envolvidos, o P2Y2, P2Y4 e P2Y6 parecem ser mais envolvidos. Os resultados mostram que a ativação de receptores P2Y atenua a infecção por *T. gondii* em macrófagos induzindo uma saída prematura do taquizóito das células hospedeiras por um mecanismo dependente de Ca^{2+} controlando a infecção por um mecanismo diferente do P2X7 (Moreira-Souza *et al.*, 2015).

A regulação positiva da infecção por *T. gondii* dos receptores P2X e P2Y em macrófagos pode, portanto, ser vista como verdadeiras armadilhas usadas pelo hospedeiro em sua luta contra o parasita. Enquanto o ATP pode mediar as respostas imunes do hospedeiro através da ativação do inflamassoma dependente

de P2X7, outros nucleotídeos através da ligação de P2Y, podem contribuir para as defesas do hospedeiro usando os mediadores inflamatórios EROs e ON.

Adenosina limita a imunopatologia da infecção por *Toxoplasma gondii*

Durante a toxoplasmose, a resposta imune confronta com o *T. gondii*, o que impede a conversão dos bradizoítos em forma de cistos, assim como impede que o parasita permaneça dormente no SNC (Suzuki, 2002). Esse delicado equilíbrio entre a sobrevivência do parasita e a resposta do hospedeiro é mediado tanto pelos mecanismos de evasão do *T. gondii* quanto por modificação no hospedeiro para evitar danos excessivos nos tecidos. Esse papel é bem desempenhado pela adenosina, a qual regula a inflamação e ao mesmo tempo atua como um sinal de dano celular para promover a migração de mais células para locais da infecção e/ou lesão tecidual.

A adenosina extracelular é um nucleosídeo de purina gerado pela desfosforilação seqüencial do ATP pelas ectoenzimas CD39 e CD73 conforme já mencionado. A adenosina exerce seus efeitos ligando-se a quatro diferentes receptores transmembranas: A1, A2A, A2B e A3. O tipo de resposta após a ativação do receptor de adenosina (AR) pelo nucleosídeo depende da célula correspondente. Por exemplo, a sinalização da adenosina através do receptor A1 promove a quimiotaxia de neutrófilos nos locais de infecção e sua adesão ao endotélio inflamado, enquanto a sinalização através do receptor A2A inibe a adesão (Etzschig *et al.*, 2006; Barletta *et al.*, 2012).

Os receptores de adenosina são altamente expressos em vários tipos celulares, incluindo células imunes e células residentes no SNC (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004). As funções desempenhadas pela adenosina extracelular envolvem tanto a supressão de citosinas pró-inflamatórias como inibe a entrada de leucócitos nos tecidos através da regulação negativa de moléculas de adesão, quimiocinas e citosinas como TNF-α, IL-1 e as EROs desencadeando a produção de citosinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Hasló *et al.*, 1996; Linden, 2001).

Diversos estudos relatam que a deleção ou supressão da enzima CD73 em camundongos *knockout* (CD73 -/-) não possui a capacidade de gerar adenosina extracelular, assim os camundongos são menos susceptíveis a infecção crônica pelo *T. gondii*, com menor número de cistos e sensibilidade reduzida à

reativação da infecção no SNC hospedeiro (Mahamed *et al.*, 2012). Observou--se um aumento na expressão de CD73 no cérebro de camundongos infectados com *T. gondii*, o que promove a diferenciação dos bradizóitos em cistos por um mecanismo dependente da geração de adenosina, uma molécula que é essencial para o ciclo de vida do parasita (Mahamed *et al.*, 2012; Antonioli *et al.*, 2013).

Um deficit na atividade da enzima CD73 pode levar não apenas a depleção de adenosina, mas também ao acúmulo de ATP a montante. Sabe-se que o ATP ativa o NLRP3 inflamassoma NLRP3 através da sinalização do receptor P2X7, levando à liberação de IL-1β e IL-18 pela via de processamento da caspase-1. É possível que a inibição ou deficiência da enzima CD73, resulte em acúmulo de ATP através de falta de antagonismo.

Embora todos os quatro receptores de adenosina participem na modulação da resposta imune, o receptor A2A tem papel de destaque ao regular vários aspectos da inflamação durante a toxoplasmose. O A2A é responsável por limitar as respostas inflamatórias através da ligação da adenosina. Estudos revelaram que camundongos *knockout* para o receptor A2A exibiram imunopatologia semelhante à dos camundongos *knockout* para CD73 (Mahamed *et al.*, 2015).

Portanto, durante o estágio agudo da infecção, a sinalização da adenosina é necessária para reduzir a inflamação e limitar o dano colateral ao tecido, enquanto a sua depleção após infecção aguda pode inibir a capacidade do parasita de formar cistos e persistir no SNC (Mahamed *et al.*, 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

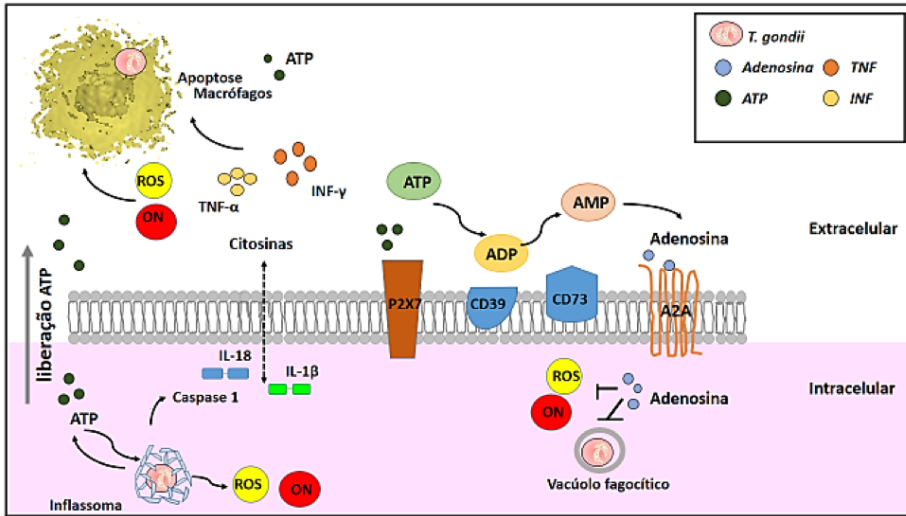
A toxoplasmose é uma doença ocasionada pelo protozoário *T. gondii* e afeta um terço da população mundial. O *T. gondii* é um parasito intracelular que infecta e sobrevive nas células imunológicas como macrófagos e em tecidos imunologicamente privilegiados como o SNC. A doença é comumente assintomática, mas apresenta manifestações clínicas graves em pacientes imunocomprometidos. A sinalização purinérgica tem sido descrita como um importante regulador imunológico durante a infecção por *T. gondii*. O sistema purinérgico parece exercer influência direta sobre as funções das células imunes, na secreção de citosinas e na eliminação do *T. gondii*.

Mediadores purinérgicos, tais como o ATP e a adenosina, são liberados no espaço extracelular como substâncias de alarme em resposta a distúrbios metabólicos ou outros tipos de insultos pelas células e operaram como sinais sensoriais, moldando as respostas imunes. Após a liberação do ATP no espaço extracelular, as enzimas CD39 e CD73 convertem o ATP até a adenosina. A expressão e a atividade das enzimas CD73 e CD39 são influenciadas de acordo com o contexto fisiopatológico da toxoplasmose. Os receptores P1 e P2 expressos na superfície das células do sistema imunológico, também regulam os níveis de ATP e adenosina extracelulares respectivamente. A alteração na homeostase celular devido à presença do *T. gondii* resulta na ativação notadamente do receptor P2X7, que ativa várias vias celulares, incluindo o inflamassoma, que leva à produção de IL-1β e IL -18 e à via da geração de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio. O envolvimento do receptor P2X7 nessas vias sugere que ele funcione como um regulador positivo, estimulando a inflamação durante a infecção.

De fato, a ausência do receptor P2X7 altera a função da célula imune. Além disso, vários polimorfismos no P2X7 também foram observados entre a população humana, o que indica uma maior susceptibilidade à doença toxoplasmose. Claramente, o receptor P2X7 compreende um importante arsenal do hospedeiro contra o *T. gondii*. Contudo, evidências têm também demonstrado um envolvimento menos acentuado dos receptores P2Y como mediadores da morte celular de *T. gondii*.

O papel da adenosina extracelular na patogênese da toxoplasmose promove a diferenciação e a formação de cistos teciduais no SNC por um mecanismo dependente da geração de adenosina. Além disso, a regulação negativa do receptor de adenosina A2A indica maior susceptibilidade a imunopatologia da toxoplasmsoe. Assim, a adenosina extracelular é um importante regulador imunológico que limita o dano tecidual colateral e promove a sobrevivência do hospedeiro.

A identificação de estratégias usadas pelo o *T. gondii* para manipular o sistema imunológico envolve uma cascata de eventos intracelulares regulados pelo sistema purinérgico do hospedeiro como mecanismos de defesa. Assim, pode eliminar o parasita e suprimir a infecção, abrindo novos caminhos para o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas direcionadas a receptores purinérgicos e mediadores a jusante.

Figura 1: Modulação da sinalização purinérgica por *T. gondii*

Fonte: autora (2019).

Legenda: ROS – espécies reativas ao oxigênio; ON – óxido nítrico; ATP – adenosina trifosfato; ADP – adenosina difosfato; AMP – adenosina monofosfato.

* A ativação de macrófagos induz a formação do inflassoma, o qual ativa a proteína caspase-1 que cliva a pró-IL-1β e a pró-IL-18 em transcritos ativos que estimulam a secreção de citosinas. Células que sofrem apoptose também liberam citosinas, principalmente INF-γ e TNF-α, além de um sinalizar de dano, o ATP. O ATP extracelular é hidrolisado de forma sequencial até adenosina pelas enzimas CD73 e CD39. O nucleotídeo ATP e o nucleosídeo adenosina também podem ser regulados por receptores acoplados a membrana das células, o P2X7 e o A2A. O P2X7 provoca a morte do *T. gondii* através da estimulação da produção de EROs e ON. A adenosina bloqueia a conversão de taquzóitos em bradizóitos além de recrutar mais células imunes para o local da infecção.

REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO, M. P.; CERUTI, S. Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. Purinergic Signal, v. 2, p. 595-604, 2006.

AKERMAN, S. E.; MULLER, S. Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in Toxoplasma gondii. J Biol Chem. v.280, p. 564-70, 2005.

ANTONIOLI, L.; PACHER, P.; VIZI, E. S.; HASKÓ, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. Trends Mol Med, v. 19, p. 355-367, 2013.

BARLETTA, K. E. *et al.* Regulation of neutrophil function by adenosine. Arterioscler Thromb Vasc Biol. v. 32, p. 856-864, 2012.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of Toxoplasma gondii is linked to parasite motility and virulence. J Exp Med. v. 195, p.1625–1633, 2002.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of Toxoplasma gondii across biological barriers. Trends Microbiology, v.11, n.9, p. 426-30, 2003.

BOURS, M. J. *et al.* Adenosine 50 -triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacol Ther. v. 112, p. 358-404, 2006.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. Nat Rev Immunol. v.16, p. 407-20, 2016.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. Cell Mol Life Sci. v.12, p. 1471-1483, 2007.

CALDAS, L. A.; *et al.* Calcium ionophore-induced egress of Toxoplasma gondii shortly after host cell invasion. Vet Parasitol. v.147, p. 210-20, 2007.

CHAUDHARY, K. *et al.* Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii. J Biol Chem. v. 279, p. 31221-31227, 2004.

CHAVES, S. P. *et al.* Modulation of P2X7 purinergic receptor in macrophages by Leishmania amazonensis and its role in parasite elimination. Microbes Infect. v. 11, p. 842-849.

CORREA, G. *et al.* Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of Toxoplasma gondii tachyzoites from infected macrophages. Microbes Infect. v. 12, p. 497-504, 2010.

CORRÊA G; *et al.* Inflammatory early events associated to the role of P2X7 receptor in acute murine toxoplasmosis. Immunobiology, v. 222, p. 676-83, 2017.

COUTINHO-SILVA, R. *et al.* 2001. Modulation of P2Z/P2X7 receptor activity in macrophages infected with Chlamydia psittaci. Am. J. Physiol. v.280, p. C81-C89, 2001.

COUTINHO-SILVA R. *et al.* Cellular alarms and whispers contribute to the polyphonic melody of danger signals required for immunity. Microbes Infect, v.14, p.1239-40, 2012.

COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D. M. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. Microbes and Infection. v. 14, p.1271-1277, 2012.

DEAGLIO, S. COUTINHO-SILVA, R. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. Adv. Pharmacol. v. 61, p. 301-332, 2011.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. *et al.* Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from Toxoplasma gondii. J. Immunol. v. 179, p. 1129-1137, 2007.

DENKERS, E. Y. *et al.* In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during Toxoplasma gondii infection. Cell Microbiol, v. 5, p. 75-83, 2003.

DENKERS, E. Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by Toxoplasma gondii. FEMS Immunol Med Microbiol. v. 39, p. 193-203, 2003.

DING, M. *et al.* The antioxidant systems in Toxoplasma gondii and the role of cytosolic catalase in defense against oxidative injury. Mol Microbiol, v. 51, p. 47-61, 2004

DŁUGOŃSKA, H. Molecular modifications of host cells by Toxoplasma gondii. Pol J Microbiol. v. 53, p. 45-54, 2004.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. Boca Raton, v. 2, p. 313, 2012a

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology. Parasitology, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012b.

ELLIOTT, M. R. *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. Nature. v. 461, 2009.

ELTZSCHIG, H. K. *et al.* Nucleotide metabolism and cell-cell interactions. Methods Mol Biol. v.341, p. 73-87, 2006.

FLANNAGAN, R. S. *et al.* Antimicrobial mechanisms of phagocytes and strategies of bacterial evasion. Nat Rev Microbiol. v.5, p. 355-66, 2009.

FREDHOLM, B. B. *et al.* International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacol Rev. v. 53, p. 527-552, 2001.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* Interleukin-12 is required for the Tlymphocyte-independent induction of interferon-gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v. 90, p. 6115, 1993.

GOUNARIS, K.; SELKIRK, M. E. Parasite nucleotide-metabolizing enzymes and host. Trends Parasitol. v. 21, p. 17-21, 2005.

HASKÓ, G. *et al.* Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 2647 macrophages and in endotoxemic mice. J Immunol. v. 157, p. 4634-4640, 1996.

HASKÓ, G, CRONSTEIN, B. N. Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. Trends Immunol. v. 25, p. 33-39, 2004.

HE, Y. *et al.* Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. Trends Biochem Sci. v. 41, p. 1012-21, 2016.

HILL, D.; DUBEY, J. P. Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. v. 8, p. 634-40, 2002.

HITZIGER, N. *et al.* Dissemination of Toxoplasma gondii to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by in vivo bioluminescence imaging. Cell Microbiol. v. 7, p. 837-48, 2005.

ILLER, C. M. *et al.* The Role of the P2X7 Receptor in Infectious Diseases. PLoS Pathog. v. 7, 11, 2011.

JAMIESON, S. E. *et al.* Evidence for associations between the purinergic receptor P2X(7) (P2RX7) and toxoplasmosis. Genes Immun. v. 11, p. 374e383, 2010.

KOPP, E.; MEDZHITOV, R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. Curr. Opin. Immunol. v. 15, p. 396-401, 2003.

KRUG, E. C. *et al.* Purine metabolism in Toxoplasma gondii. J Biol Chem. v. 264, p. 10601-10607, 1989.

LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: Host cell subversion and immune evasion by Toxoplasma gondii. Cell Microbiol. v. 12, p. 292-300, 2010.

LAMMAS, D. A. *et al.* ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z (P2X7) receptors. Immunity. v. 7, p. 433-444, 1997.

LESS, M. P. *et al.* P2X7 Receptor-Mediated Killing of an Intracellular Parasite, Toxoplasma gondii, by Human and Murine Macrophages. J Immunol. v. 15, p. 7040-6, 2010.

LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: Receptor-mediated mechanisms of tissue protection. Annu Rev Pharmacol Toxicol. v. 41, p. 775-787, 2001

MACK, D. G. *et al.* HLA- class II genes modify outcome of Toxoplasma gondii infection. Int J Parasitol. v. 29, p.1351-1358, 1999.

MAHAMED, D. A.; MILLS, J. H.; EGAN, C. E.; DENKERS, E. Y.; BYNOE, M. S. CD73-generated adenosine facilitates Toxoplasma gondii differentiation to long-lived tissue cysts in the central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA. v. 109, p.16312-16317, 2012 a.

MAHAMED, D. *et al.* CD73-generated adenosine limits immunopathology during acute Toxoplasma gondii (164,17). J Immunol. v. 1, S. 164,17, 2012b.

MAHAMED, D. A.; TOUSSAINT, L. E.; BYNOE, M. S. CD73-generated adenosine is critical for immune regulation during Toxoplasma gondii infection. Infect Immun, v. 83, p. 721-729, 2015.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD. O. Toxoplasmose. Lancet, v. 363, p. 1965-76, 2004.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of Toxoplasma gondii infection during pregnancy. Clin Infect Dis. v. 47, p. 554-566, 2008.

MORDUE, D. G.; SIBLEY, L. D. Intracellular fate of vacuoles containing Toxoplasma gondii is determined at the time of formation and depends on the

mechanism of entry. J Immunol. v. 159, p. 4452-9, 1997.

MORREIRA-SOUZA, A. C. A. *et al.* The P2X7 Receptor Mediates Toxoplasma gondii Control in Macrophages through Canonical NLRP3 Inflammasome Activation and Reactive Oxygen Species Production. Front Immunol. v. 8, p. 1257, 2017.

PICCINI, A. *et al.* ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. Proc Natl Acad. v. 105, p. 8067-8072, 2008.

PIFER, R.; YAROVINSKY, F. Innate responses to Toxoplasma gondii in mice and humans. Trends in Parasitology. v. 27, 2011.

PLATTNER, F. *et al.* Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. Cell Host Microbe. v. 3, p. 77-87, 2008.

PRAETORIUS, H. A.; LEIPZIGER, J. ATP releasing non-excitable cells, Purin Sinall. v. 5 ,p. 433 – 446, 2009.

REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIE, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. *In*: Remington JS, Baker C, Wilson E, Klein JO (ed.). Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 6th edn. WB Saunders: Philadelphia, PA, 2005, p. 947-1091.

SCANGA, C. A. *et al.* Cutting edge: MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. J. Immunol. v. 168, p. 5997-6001, 2002.

SIBLEY, L. D. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. J Immunol. v. 147, p. 2340-2345, 1991.

SIBLEY, L. D. Toxoplasma gondii: perfecting and intracellular life style. Traffic, v. 4, p. 581-586, 2003.

SULLIVAN, W. J.; JEFFERS, J. R. V. Mechanisms of Toxoplasma gondii persistence and latency. FEMS Microbiol Rev. v. 36, p. 717-733, 2012.

SUZUKI, Y. *et al.* Interferon-gamma – the major mediator of resistance against Toxoplasma-gondii. Science. v. 240, p. 516-518, 1988.

SUZUKI, Y. Host resistance in the brain against Toxoplasma gondii. J Infect Dis. v. 185, p. 58-S65, 2002.

WANG, Z. D. *et al.* Toxoplasma gondii infection in immunocompromised patients: a systematic review and meta-analysis. Front Microbiol. v. 8, p. 389, 2017.

WEISS, L. M.; KIM, K. Toxoplasma gondii. The model Apicomplexan: Perspectives and Methods. Elsevier, Burlington (US), 2007, p. 801.

YAROVINSKY, F. Toll-like receptors and their role in host resistance to Toxoplasma gondii. Immunol Lett. v. 119, p. 17-21, 2008.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide – and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. Biochim Biophys Acta. v. 1783, p. 673-694, 2008.

SISTEMA PURINÉRGICO E O HIV

Filomena Marafon
Cadieli Oliana Reichert
Celso Spada
Margarete Dulce Bagatini

INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) ocasiona uma infecção com ativação crônica do sistema imunológico. Trata-se de um grave problema de saúde pública, uma vez que, atualmente, 36,9 milhões de pessoas no mundo vivem com esse vírus (Who, 2018). O HIV infecta células com receptor CD4, ocasionando morte celular, sendo que a infecção transcorre de forma lenta e progressiva até o desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). A AIDS é uma doença caracterizada por imunossupressão profunda, ativação de infecções oportunistas, presença de tumores e degeneração tecidual (Barré-Sinoussi; Ross; Delfraissy, 2013; Deeks *et al.*, 2015).

Em decorrência dos inúmeros impactos ocasionados pela infecção do HIV e da ausência de tratamento efetivo, torna-se relevante conhecer os mecanismos metabólicos e bioquímicos que podem estar associados a essa infecção, como a atuação de mecanismos sinalizadores frente ao vírus, entre os quais, a sinalização purinérgica.

O sistema de sinalização purinérgica é constituído pelos nucleotídeos ATP (trifosfato de adenosina), ADP (difosfato de adenosina) e AMP (monofosfato de adenosina), e nucleosídeo adenosina (ADO), receptores purinérgicos e ectoenzimas, os quais atuam na sinalização celular frente a situações de dano,

injúria e distúrbios, representando uma importante via moduladora de inúmeros processos fisiológicos, entre os quais modulação da resposta inflamatória e imunológica, tendo atuação na infecção ocasionada pelo HIV (Burnstock, 2006).

Dessa forma, é fundamental determinar a ação do sistema purinérgico na fisiopatologia do HIV, verificando efeitos imunossupressores e imunoestimuladores, os quais podem influenciar a sequência de eventos ocasionados pelo vírus, e auxiliar na busca de possíveis terapêuticas complementares com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos infectados.

Sistema imunológico e o HIV

Constituído por uma rede de órgãos, células e moléculas, o sistema imunológico visa à manutenção da homeostase do organismo, atuando como primeira linha de defesa frente ao dano tecidual e infecções. Falhas em seu desenvolvimento e funcionalidade são denominadas imunodeficiências, podendo ser congênitas/primárias ou adquiridas/secundárias, levando ao desenvolvimento de condições fisiopatológicas (Abbas; Lichtman, Andrew H. Pillai, 2008; Abbas; Lichtman, 2009).

Entre as imunodeficiências adquiridas, a de maior destaque é a infecção ocasionada pelo HIV, que compreende um retrovírus do gênero *Lentivírus* família *Retroviredae*, o qual apresenta partícula infecciosa de dupla fita de RNA no interior do núcleo proteico, circundado por um envelope lipídico proveniente da célula hospedeira infectada. Esse retrovírus caracteriza-se por apresentar longo período de latência, capacidade de evasão do sistema imunológico, tropismo pelas células com receptores de superfície do tipo CD4, e desenvolvimento de doença de progressão lenta (Barré-Sinoussi; Ross; Delfraissy, 2013; Maartens; Celum; Lewin, 2014; Deeks *et al.*, 2015).

Os primeiros relatos de infecção ocasionada pelo HIV foram registrados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Center for disease control*) nos anos de 1977-1978, em regiões do Haiti e África Central. Nos Estados Unidos da América (EUA), o primeiro relato ocorreu em 1981, em indivíduo com infecção fúngica ocasionada pelo *Pneumocystis carinii* e presença de Sarcoma de Kaposi. Em 1984, o vírus foi isolado pela equipe do pesquisador Luc Montagnier (CDC, 1981; Barré-Sinoussi F. *et al.*, 1983).

No Brasil, o primeiro caso da infecção foi confirmado na cidade de São Paulo, em 1982; subsequentemente, casos foram registrados em populações de maior exposição ao risco. Atualmente, cerca de 37 milhões de pessoas em todo o mundo vivem com o vírus. No Brasil, em 2017, foram diagnosticados 42.420 novos casos de HIV e 37.791 casos de AIDS. Dados epidemiológicos indicam que, entre os anos de 1980 e 2018, foram registrados 982.129 casos de AIDS no país (Brasil, 2018; UNAIDS, 2018; WHO, 2018).

A infecção pelo HIV ocasiona depleção e morte celular devido ao efeito citopático do vírus e destruição da arquitetura dos órgãos linfoides. O HIV acomete principalmente os linfócitos T CD4+, além de células dendríticas e macrófagos, podendo conduzir a uma doença crônica denominada AIDS, caracterizada por imunossupressão profunda, ativação de infecções latentes e oportunistas, surgimento de tumores malignos como o Sarcoma de Kaposi, febre, linfadenopatia, perda de peso e degeneração do sistema nervoso central (SNC), compreendendo uma doença infectocontagiosa de grande preocupação para a saúde pública (Montagnier, 2009; Barré-Sinoussi, 2010; Barré-Sinoussi; Ross; Delfraissy, 2013; Naif, 2013; Deeks *et al.*, 2015).

O ciclo de vida deste vírus no hospedeiro compreende a infecção das células-alvos pela ligação ao receptor CD4, sendo necessária a presença de receptores de quimiocinas (o CXCR4 nas células T e o CCR5 nos macrófagos). Após a ligação à superfície celular, a glicoproteína gp120 promove alteração conformacional da glicoproteína gp41 e exposição do peptídeo de fusão, permitindo a fusão das membranas virais e do hospedeiro para entrada do genoma viral no citoplasma. Sequencialmente, tem-se a transcrição genômica do vírus em DNA pró-viral, integração do pró-vírus ao material genético da célula hospedeira, transcrição do genoma do vírus e síntese proteica viral. As partículas virais do HIV sintetizadas compreendem transcritos de RNA pró-viral em um complexo de nucleoproteínas, as quais brotam em novo vírion, propagando a infecção pelo organismo (Moss, 2013; Maartens; Celum; Lewin, 2014; Deeks *et al.*, 2015).

A transmissão do HIV ocorre pelo contato com os fluidos biológicos de sangue, sêmen, fluidos cérvico-vaginais ou leite materno contendo partículas virais. Outros fluidos biológicos que apresentam o vírus em quantidades muito baixas, como saliva, lágrimas, urina e líquido cefalorraquidiano, são denominados não transmissores do HIV (Lashley, 2006; Nanjul, 2011). As vias de

infecção do vírus constituem, portanto, o contato sexual desprotegido, o compartilhamento de agulhas contaminadas por usuários de drogas intravenosas, os acidentes com agulhas infectadas, a transferência transplacentária (*in utero*) ou durante o parto, o aleitamento materno e a transfusão de sangue ou de hemoderivados infectados (Lashley, 2006; Brasil, 2013).

O diagnóstico do HIV é realizado pela verificação da sorologia positiva ao vírus, com o objetivo de sua detecção precoce, e o monitoramento de progressão da infecção é realizado pelas contagens das subpopulações de linfócitos T, células CD4+ e CD8+, e pela carga viral (Brasil, 2013; Moss, 2013; Naif, 2013).

A infecção ocasionada pelo HIV caracteriza-se por uma ativação crônica do sistema imunológico, sendo que a evolução e a progressão da doença relacionam-se diretamente a determinantes do vírus e do indivíduo infectado, assim como pela interação entre fatores virais e do hospedeiro (Barré-Sinoussi; Ross; Delfraissy, 2013). O organismo desenvolve respostas inatas e adaptativas para defesa frente ao vírus, porém, o hospedeiro, em decorrência dos inúmeros mecanismos de evasão viral, apenas consegue reduzir a replicação (Deeks *et al.*, 2015).

A evolução clássica da infecção consiste em uma fase inicial aguda e inespecífica seguida de uma fase assintomática com replicação e morte viral constantes, ocorrendo forte interação entre as células de defesa e constantes e rápidas mutações do vírus. Posteriormente, ocorre uma fase sintomática inicial e a AIDS, que se caracteriza por contagens de linfócitos T CD4+ abaixo de 200 células/mm3 e o desenvolvimento da sintomatologia da doença (Brasil, 2013; Moss, 2013; Naif, 2013).

O tratamento da infecção ocasionada pelo HIV e da AIDS consiste na terapêutica denominada HAART (do inglês *highly activity antiretroviral therapy*), que inclui a administração combinada de três classes de agentes antirretrovirais – inibidores da transcriptase reversa, inibidores de protease e inibidores da integrase – que visam às moléculas virais. Em indivíduos com infecções associadas utiliza-se profilaxia adequada complementar a HAART. A utilização da terapia antirretroviral possibilitou a progressão mais lenta da doença e diminuição da incidência de infecções oportunistas, câncer e degeneração do sistema nervoso central (SNC) (Montagnier, 2009; Barré-Sinoussi, 2010).

Como a infecção causada pelo HIV não apresenta um tratamento curativo e tem grande impacto na saúde pública mundial, torna-se relevante conhecer

os mecanismos imunológicos e bioquímicos que podem estar associados a essa infecção, a fim de encontrar possíveis terapêuticas complementares e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos infectados.

Sistema purinérgico e o sistema imunológico

Devido à infecção pelo HIV ocasionar uma ativação crônica do sistema imunológico, indica-se que, possivelmente, mecanismos sinalizadores – sistema purinérgico, por exemplo – apresentam correlação com a progressão e prognóstico da infecção.

O sistema purinérgico compreende uma rede de sinalização celular, representando uma importante via moduladora de inúmeros processos fisiológicos, como modulação da resposta inflamatória e imunológica, atuando também na neurotransmissão e neuroproteção, no mecanismo da dor, na agregação plaquetária e tromborregulação, na vasodilatação mediada pelo endotélio, na proliferação e morte celular (Burnstock, 1972, 2006; Martins *et al.*, 2016).

O sistema de sinalização purinérgica tem suas moléculas sinalizadoras liberadas para o espaço extracelular em resposta a situações de dano, injúria e distúrbios metabólicos, nas quais essas moléculas vão atuar como sinais sensoriais moduladores da resposta imune. No sistema imunológico, a sinalização purinérgica atua como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) frente às lesões inflamatórias e apresenta-se associada à: interação entre células; secreção de citocinas; quimiotaxia; ativação, modelagem e direcionamento de células imunes; remoção de patógenos intracelulares e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Antonioli *et al.*, 2013; Pacheco *et al.*, 2014).

A realização das funções purinérgicas ocorre em decorrência da expressão dos purinoreceptores (P1 e P2) e das ectoenzimas na superfície das células imunes, sendo que a ativação dos receptores desencadeia o efeito imunomodulador das purinas, o qual é finalizado pela degradação sequencial das ectoenzimas. Receptores do tipo P2 são expressos em diferentes células, sendo que os metabotrópicos acoplados a proteínas G – P2Y foram caracterizados em neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas (CD), células *natural killer* (NK), linfócitos T e B. Subtipos de receptores ionotrópicos – P2X são expressos em fagócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T e

mastócitos. Os receptores do tipo P1 são amplamente expressos na superfície de todas as células imunes da linhagem mieloide e linfoide (Antonioli *et al.*, 2013; Di Virgilio; Vuerich, 2015; Passos *et al.*, 2018).

As ectoenzimas purinérgicas, particularmente a ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase do tipo 1 (E-NTPDase1 ou CD39) e a ecto-5'-nucleotidase (CD73), atuam na metabolização dos nucleotídeos de adenina, regulando a duração e composição do "halo purinérgico" que circunda as células imunes. Elas são consideradas interruptores imunológicos, estando associadas com respostas frente a condições fisiopatológicas, como a AIDS (Bours *et al.*, 2006; Antonioli *et al.*, 2013; Di Virgilio; Vuerich, 2015). As ectoenzimas são expressas em praticamente todas as células do sistema imunológico. As E-NTPDases são expressas em células NK, subconjuntos de células T como os linfócitos T regulatórios (Treg), macrófagos e CDs (Schachter *et al.*, 2015).

O nucleotídeo ATP tem sua atividade imune correlacionada as suas concentrações, podendo atuar como molécula imunoestimulante ou imunodepressora, sendo que seus sinais extracelulares são detectados e transduzidos por receptores do tipo P2 (Di Virgilio; Vuerich, 2015).

O ATP modula a diferenciação, atua na sinalização de migração, quimiotaxia celular e sinalização para morte celular. Essa molécula, quando ligada ao receptor P2X7, relaciona-se à estimulação mitogênica de linfócitos T, promovendo a modulação das células Treg no fenótipo pró-inflamatório Th17, secretando citocinas IL-1β e IL-18 e ativando o inflamossoma, estimulando a morte bacteriana e apoptose dos macrófagos (Pacheco *et al.*, 2014; Di Virgilio; Vuerich, 2015). A ligação do ATP ao receptor P2Y2 promove um sinal de atração para monócitos/macrófagos; quanto aos receptores P2Y12 e P2X4, tem-se extensão e migração das micróglias; e o subtipo P2Y6 foi descrito como desencadeador da fagocitose microglial (Bours *et al.*, 2006; Burnstock; Boeynaems, 2014).

A molécula do ATP também exerce diversas atividades nas CDs, ao ligar-se com o receptor P2Y2 promove quimiotaxia; o acoplamento ao P2Y11 associado a uma resposta Th2 promove semimaturação e expressão de moléculas co-estimuladoras; ao ligar-se com o P2X7, têm-se a indução do inflamassoma, secreção de IL-1β e efeito pró-inflamatório; e o acoplamento ao receptor P2Y12 promove a endocitose do antígeno (Burnstock; Boeynaems, 2014).

Concentrações baixas do nucleosídeo ADO são encontradas extracelularmente em condições fisiológicas, promovendo proteção e regeneração tecidual

imunológica, o acúmulo dessa molécula decorre principalmente da via de hidrólise dos nucleotídeos pelas ectoenzimas, porém, a ADO em quantidades elevadas representa um aumento exacerbado da imunossupressão, ocasionando dificuldades de eliminação de vírus e do controle da replicação viral (Passos *et al.*, 2018).

A ADO é reconhecida como potente molécula imunossupressora, e seus sinais são detectados e transduzidos por receptores P1. A funcionalidade imunossupressora está associada ao fato de seu acoplamento aos subtipos de receptores A2A e A2B, que exercem efeitos inibitórios e promovem o aumento das concentrações de AMP cíclico (AMPc) nos linfócitos e timócitos (Antonioli *et al.*, 2013; Di Virgilio; Vuerich, 2015). O AMPc modula inúmeros processos imunossupressores, atuando na função, proliferação e ativação de células imunes, porém, em níveis elevados é considerado tóxico (Passos *et al.*, 2018).

A ADO também é reconhecida como potente inibidor da agregação plaquetária e modulador do tônus vascular. Ela atua inibindo a proliferação de linfócitos T e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, TNF-α e IFN-γ, e promove a secreção das citocinas anti-inflamatórias (Nikolova *et al.*, 2011; Pacheco *et al.*, 2014; Rezer *et al.*, 2007, 2018).

Esse nucleosídeo modula a diferenciação das células imunes, promovendo expansão das células envolvidas na imunossupressão e ocasionando a inibição da mobilidade celular, da migração para os gânglios linfáticos e da adesão ao endotélio. A atuação da ADO nas células dendríticas ocorre pela ligação aos subtipos de receptores A2A e A2B, favorecendo a polarização ao fenótipo celular do tipo Th2 (Burnstock; Boeynaems, 2014; Di Virgilio; Vuerich, 2015).

Sistema purinérgico e o HIV

O sistema purinérgico apresenta inúmeras funcionalidades relacionadas às células do sistema imunológico. Atua diretamente em sinalizações de dano, recrutamento e polarização das células imunes, apresentando efeitos imunossupressores e imunoestimuladores. Dessa forma, ele pode influenciar na sequência de eventos fisiopatológicos, resposta imune inata e adaptativa frente ao agente infeccioso, na progressão e no prognóstico da infecção ocasionada pelo HIV (Antonioli *et al.*, 2013).

Os receptores do sistema purinérgico podem favorecer a entrada do vírus no organismo, enquanto as ectoezimas purinérgicas podem atuar bloqueando a progressão da doença e melhorando a resposta imune contra o vírus (Leal *et al.*, 2005). O conhecimento do padrão de atividade e expressão de componentes do sistema purinérgio em indivíduos infectados pelo vírus HIV é muito importante para o entendimento dos mecanismos da doença e possibilitará a inclusão de antagonistas desses sinalizadores como uma possível terapêutica complementar para o vírus.

Ectoenzimas purinérgicas e o HIV

Segundo Antonioli e colaboradores (2013), a via de hidrólise promovida pelas ectoenzimas CD39 e CD73 atua de forma dinâmica com o contexto fisiopatológico no qual está inserida, como no caso da infecção ocasionada pelo HIV, sugerindo que essas ectoenzimas também podem atuar como futuros alvos terapêuticos. Outros autores verificaram que os efeitos inibitórios das células Treg são minimizados por regulação negativa da CD39, além de um polimorfismo no gene que codifica essa ectoenzima indicar uma progressão mais lenta para a AIDS (Nikolova *et al.*, 2011; Burnstock; Boeynaems, 2014; Schachter *et al.*, 2015; Passos *et al.*, 2018).

Nikolova e colaboradores (2009; 2011) verificaram uma expressão aumentada de CD39 associada às células Treg em indivíduos HIV soropositivos, promovendo ativação imune exagerada, menor contagem de linfócitos T CD4+ e inibição da proliferação dos linfócitos T CD8+, indicando um envolvimento da expressão desta ectoenzima com a progressão da infecção crônica pelo HIV. O efeito inibitório das células Treg foi diminuído utilizando agonistas de adenosina. Jenabian *et al.* (2013) também correlacionaram a expressão aumentada de CD39 em células Treg com a progressão da infecção ocasionada pelo HIV, os autores indicaram que células T de indivíduos com HIV têm uma expressão mais elevada do receptor A2A, bem como uma maior geração de AMPc e uma menor produção de IL-2, contribuindo para imunossupressão.

Leal e colaboradores (2005) mostraram um aumento da atividade da NTPDase e da expressão de CD39 em linfócitos de pacientes HIV-soropositivos, sugerindo um importante desempenho da ectoenzima no controle da função dos

linfócitos. Wiesch *et al.* (2011) verificaram um aumento da expressão de CD39 em indivíduos HIV-soropositivos e uma correlação com o menor número absoluto de células Treg.

Biomoléculas purinérgicas, purinoreceptores e HIV: o nucleotídeo ATP, seus receptores e o HIV

As biomoléculas purinérgicas ligam-se a seus receptores e desencadeiam sua função de sinalização celular, atuando diretamente na infecção ocasionada pelo HIV.

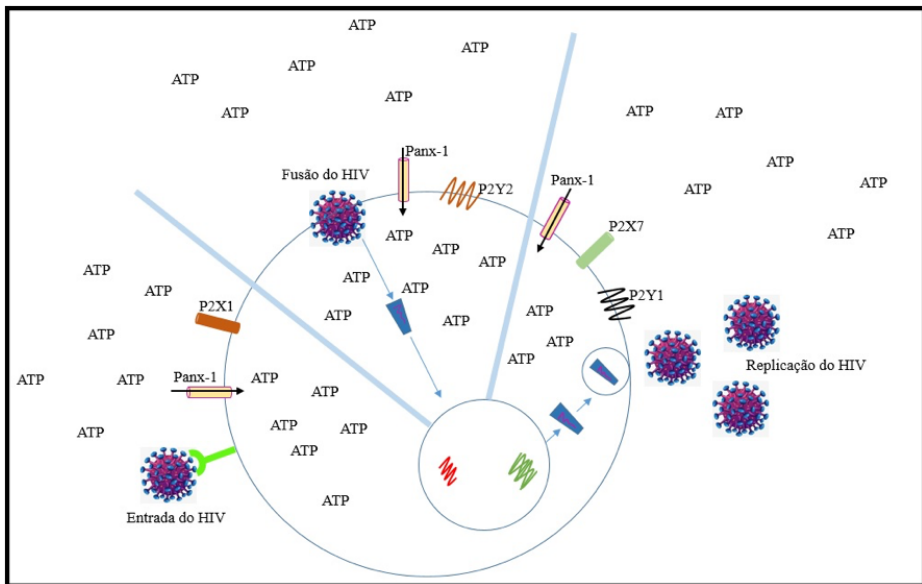
Barat e colaboradores (2008) postularam que concentrações micromolares de ATP extracelular poderiam reduzir a transferência do vírus HIV de CDs imaturas para células T CD4+. A diminuição da atividade da NTPDase em macrófagos e a alta concentração de ATP também se relacionou a diminuição da replicação. Wagner (2011) indicou que o ATP extracelular está associado com a secreção de citocinas IL-1 e IL-12, atuando na modulação e diferenciação celular no HIV, induzindo o perfil fenotípico Th1, o autor também associou o ATP a sinalização de apoptose indicando que essa molécula pode ser utilizada para promover a morte celular programada, eliminando células que apresentam reservatórios de partículas infecciosas. Porém, outros autores indicaram que o ATP atua facilitando a entrada do vírus na célula do hospedeiro (Séror *et al.*, 2011; Hazleton; Berman; Eugenin, 2012; Schachter *et al.*, 2015).

Séror e colaboradores (2011) determinaram que receptores purinérgicos modulam a infecção ocasionada pelo HIV-1. As glicoproteínas do envelope viral estimulam a liberação de ATP pelos canais da panexina-1(Panx-1), promovendo interação entre a proteína do envelope viral e os receptores específicos da célula-alvo. A atuação do ATP ocorre principalmente no receptor P2Y2, ativando a tirosina cinase 2 (Pyk2), a qual promove a despolarização da membrana plasmática e estimula a fusão entre a membrana viral e do hospedeiro. Os autores indicaram que esta via sinalizadora pode representar importante alvo terapêutico para o bloqueio da fusão viral.

Swartz e colaboradores (2014) correlacionaram a sinalização purinérgica com a infecção ocasionada pelo HIV, indicando que receptores do tipo P2X atuam diretamente na fusão entre as membranas, e a utilização de antagonistas

desses receptores inibiu efetivamente a infecção célula-célula, sugerindo que esses receptores são potentes alvos terapêuticos (Swartz *et al.*, 2014; Swartz; Dubyak; Chen, 2015).

Passos e colaboradores (2015) indicaram que o HIV promove a liberação de ATP, consequentemente os canais de Panx-1 são abertos e têm-se a ativação dos receptores purinérgicos, particularmente o P2X1, que permite a entrada viral; o receptor P2Y2 apresenta-se associado com despolarização e facilita a fusão das membranas, e os receptores P2X7 e P2Y1 estão envolvidos nas fases posteriores de replicação viral. A Figura 1 representa a correlação do ATP e receptores purinérgicos na infecção ocasionada pelo HIV.

Figura 1: Representação do envolvimento dos purinoreceptores na infecção ocasionada pelo vírus HIV

Fonte: Passos, Schetinger e Leal (2015) – adaptada.

* Os canais de panexina-1 (Panx-1) permanecem abertos em resposta à liberação de ATP. O receptor do subtipo P2X1 tem sido relacionado à entrada viral, P2Y2 ao estímulo de despolarização e fusão viral, P2X7 e P2Y1 estão associados a fases posteriores da infecção, como na replicação viral.

O receptor P2X7 relaciona-se ao influxo de potássio e ativação do inflamassoma NLRP3, que conduz a ativação da via da caspase-1 levando a morte celular, sendo que esse receptor pode se associar diretamente a depleção celular em indivíduos HIV soropositivos (Passos; Schetinger; Leal, 2015; Passos *et al.*, 2018).

Os macrófagos constituem um dos tipos celulares infectados pelo HIV e atuam de forma significativa para a progressão da infecção. As células infectadas constituem reservatórios virais dos vírions de HIV e podem migrar para o SNC, ocasionando neurotoxicidade e degeneração. Hazleton e colaboradores (2012) demonstraram que o receptor purinérgico P2X1 atua na entrada do HIV nos macrófagos, facilitando a ligação da proteína gp120 aos macrófagos devido a um mecanismo de regulação associado ao aumento de cálcio intracelular, estimulando a liberação de ATP e permitindo a entrada e replicação viral. Esses dados corroboram a correlação da inibição de CD39 como alvo terapêutico.

Graziano e colegas (2015) verificaram que o ATP extracelular promove uma rápida liberação das partículas infecciosas contidos nos macrófagos através da interação com o receptor P2X7, promovendo progressão da infecção. Os autores também demonstraram que o fármaco Imipramina (agente antidepressivo) bloqueia essa liberação.

Segundo os estudos de Giroud e colaboradores (2015), demonstraram que o agonista do receptor P2X1 – NF279 – inibe a fusão do HIV-1 e bloqueia a interação do vírus com coreceptores em linhagens primárias de macrófagos, sugerindo que receptores do tipo P2X estão envolvidos na sinalização de entrada do HIV-1.

O nucleosídeo ADO, seus receptores e o HIV

O HIV prejudica a ativação, funcionalidade e sobrevivência das células do sistema imunológico, principalmente em decorrência da ligação aos receptores A2A e A2B conduzindo a uma exacerbada produção de AMPc, ADO e consequente imunossupressão, com alto prejuízo em indivíduos que apresentam deficiência da ectoenzima adenosina desaminase (ADA) (Passos *et al.*, 2018).

Em indivíduos infectados pelo HIV, a ADA estimula as CDs, aumentando sua estimulação e polarização em fenótipo Th1, assim como promove secreção de IL-12, TNF-α e IL-6. Nos linfócitos T CD8+, essa ectoenzima aumenta a atividade

da telomerase, permitindo a neutralização dos efeitos da ADO na promoção de senescência replicativa (Passos; Schetinger; Leal, 2015; Passos *et al.*, 2018).

A glicoproteína viral gp120, que inicia a ligação viral a célula do hospedeiro, atua no organismo impedindo a interação da ADA com o receptor de superfície CD26; consequentemente, há um efeito inibitório nas células T, que diminui sua proliferação, reduz as funções imunomoduladoras das células Treg e gera ADO. O aumento das concentrações de ADA in vitro associou-se menor carga viral do HIV e maior contagem de células T CD4+ (Martinez-Navio *et al.*, 2011; Passos *et al.*, 2018).

Assim, as informações sobre o sistema purinérgico e o HIV nos permitem identificar a atuação dessa sinalização frente a infecção, porém ressalta-se a importância da continua pesquisa na área, para melhor compreensão da interação entre estes eventos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sinalização purinérgica, em especial a interação das moléculas sinalizadoras ATP e ADO com determinados receptores purinérgicos (P2X1, P2X7, P2Y1, P2Y2, A2A e A2B), relaciona-se diretamente com a ativação crônica do sistema imunológico: entrada, fusão e replicação viral do HIV e resposta imune deficiente frente à infecção ocasionada pelo vírus, indicando que essa via sinalizadora representa um importante mecanismo na elucidação da infecção ocasionada pelo HIV.

Como a infecção pelo HIV e a AIDS se constituem uma doença crônica incurável associada a inúmeras sequelas e comorbidades nos indivíduos infectados, além de representar grave preocupação para a saúde pública, torna-se de fundamental relevância conhecer as vias metabólicas associadas para melhorar a saúde das pessoas infectadas pelo vírus, em longo prazo.

Assim, a correlação encontrada entre os componentes do sistema purinérgico e as vias inflamatórias e infecciosas do HIV pode permitir a elaboração de estratégias terapêuticas que tenham como alvo esses componentes. Assim, direciona uma melhor resposta imunológica do organismo infectado e, consequentemente, um aumento de sobrevida e melhora na qualidade de vida dos indivíduos HIV-soropositivos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, ANDREW H. PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Imunologia Básica: Funções e distúrbios do sistema imunológico. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

ANTONIOLI, L. *et al.* CD39 and CD73 in immunity and inflammation. Trends. Mol. Med., v. 16, n. 6, p. 355-367, 2013.

BARAT, C. *et al.* Extracellular ATP reduces HIV-1 transfer from immature dendritic cells to CD4 + T lymphocytes. Retrovirology, v. 5, n. 30, p. 1-15, 2008.

BARRÉ-SINOUSSI, F. HIV: A discovery opening the road to novel scientific knowledge and global health improvement. Virology, v. 397, p. 255-259, 2010.

BARRÉ-SINOUSSI, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J.-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. Nature Reviews Microbiology, v. 11, p. 877-883, 2013.

BARRÉ-SINOUSSI F, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science, v. 220, p. 868-871., 1983.

BOURS, M. J. *et al.* Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacology & Therapeutics 112, v. 112, p. 358-404, 2006.

BRASIL, M. DA S. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 1, p. 1–56, 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_infeccao_hiv.pdf. Acesso em: 11 fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2018. Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 1, p. 1-131, 2018. Disponível em: http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-hivaids-2018. Acesso em: 11 de fev. 2019.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. Pharmacolo, v. 24, p. 509-581, 1972.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling. Journal of Pharmacology, v. 147, n. 1, p. 172-181, 2006.

BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M. Purinergic signalling and immune cells. Purinergic Signalling, v. 10, n. 4, p. 529-564, 2014.

CDC, Center for Desease Control. Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men. New York. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, v. 30, p. 305-308, 1981.

DEEKS, S. G. *et al.* HIV infection. Nature Reviews Disease Primers, v. 1, p. 01-22, 2015.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, v. 191, p. 117-123, 2015.

GIROUD, C. *et al.* P2X1 Receptor Antagonists Inhibit HIV-1 Fusion by

Blocking Virus- Coreceptor Interactions. Journal of Virology, v. 89, n. 18, p. 9368-9382, 2015.

GRAZIANO, F. *et al.* Extracellular ATP induces the rapid release of HIV-1 from virus containing compartments of human macrophages. PNAS Plus – Microbiology, v. 8, p. E3265-E3273, 2015.

HAZLETON, J. E.; BERMAN, J. W.; EUGENIN, E. A. Purinergic Receptors are Required for HIV-1 Infection of Primary Human Macrophages. J Immunol, v. 188, n. 9, p. 4488-4495, 2012.

JENABIAN, M. *et al.* Regulatory T Cells Negatively Affect IL-2 Production of Effector T Cells through CD39 / Adenosine Pathway in HIV Infection. PLoS Pathogens, v. 9, n. 4, p. 1-11, 2013.

LASHLEY, F. R. Transmission and Epidemiology of HIV/AIDS: a Global View. Nursing Clinics of North America, v. 41, n. 3, p. 339-354, 2006.

LEAL, D. B. R. *et al.* Characterization of NTPDase (NTPDase1; Ecto-apyrase; ecto- diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1721, n. 1-3, p. 9-15, 2005.

MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. Lancet., v. 384, n. 9939, p. 258-271, 2014.

MARTINEZ-NAVIO, J. M. *et al.* Adenosine deaminase potentiates the generation of effector , memory , and regulatory CD4+ T cells. Journal of Leukocyte Biology, v. 89, n. 1, p. 127-136, 2011.

MARTINS, C. C. *et al.* Regular exercise training reverses ectonucleotidase alterations and reduces hyperaggregation of platelets in metabolic syndrome patients. Clinica Chimica Acta, v. 454, p. 66-71, 2016.

MONTAGNIER, L. 25 Years after HIV discovery: Prospects for cure and vaccine. Virology, v. 48, n. 32, p. 5815-5826, 2009.

MOSS, J. A. HIV/AIDS Review. Radiologic Technology, v. 84, n. 3, p. 247-267, 2013.

NAIF, H. M. Pathogenesis of HIV infection. Infectious Disease Reports, v. 5, n.1, p. 26-30, 2013.

NANJUL, G. O. Human immunodeficiency virus transmission and hemophilia. Global View of HIV Infection, v. 149, n. 6, p. 1379-1380, 2011.

NIKOLOVA, M. *et al.* Regulatory T cells inhibit CD8 T cell proliferation in HIV-1 infection through CD39/ adenosine pathway. Retrovirology, v. 6, n. Suppl 3, p. 0-20, 2009.

NIKOLOVA, M. *et al.* CD39/ adenosine pathway is involved in AIDS progression. PLoS Pathogens, v. 7, n. 7, 2011.

PACHECO, P. A. F. *et al.* Putative roles of purinergic signaling in human immunodeficiency virus-1 infection. Biology Direct, v. 9, n. 21, p. 1-12, 2014.

PASSOS, D. F. *et al.* Adenosine signaling and adenosine deaminase regulation of immune responses : impact on the immunopathogenesis of

HIV infection. Purinergic Signalling, v. 14, p. 309-320, 2018.

PASSOS, D. F.; SCHETINGER, M. R. C.; LEAL, D. B. R. Purinergic signaling and human immunodeficiency virus/ acquired immune deficiency syndrome: From viral entry to therapy. World Journal of Virology, v. 4, n. 3, p. 285-294, 2015.

REZER, J. F. P. *et al.* Condições ideais de pH e temperatura para a atividade da NTPDase em linfócitos de pacientes imunodeprimidos pela infecção causada pelo HIV-1. Disc. Scientia, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2007.

REZER, J. F. P. *et al.* Microbial Pathogenesis Changes in inflammatory/ cardiac markers of HIV positive patients. Microbial Pthogenesis, v. 114, n. November 2017, p. 264-268, 2018.

SCHACHTER, J. *et al.* Inhibition of ecto-ATPase activities impairs HIV-1 infection of macrophages. Immunobiology, v. 220, n. 5, p. 589–596, 2015.

SÉROR, C. *et al.* Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. The Journal of Experimental Medicine, v. 208, n. 9, p. 1823-1834, 2011.

SWARTZ, T. H. *et al.* P2X-Selective Purinergic Antagonists Are Strong Inhibitors of HIV-1 Fusion during both Cell-to-Cell and Cell-Free Infection. Journal of Virology, v. 88, n. 19, p. 11504-11515, 2014.

SWARTZ, T. H.; DUBYAK, G. R.; CHEN, B. K. Purinergic Receptors : Key Mediators of Hiv-1 infection and inflammation. Frontiers in Immunology, v. 6, n. 585, p. 1-9, 2015.

UNAIDS. Estatísticas AIDS. 2018. Disponível em: https://unaids.org.br/estatisticas/. Acesso em: 30 jan. de 2019.

WAGNER, M. C. E. The Therapeutic Potential of Adenosine Triphosphate as an Immune Modulator in the Treatment of HIV / AIDS : A Combination Approach with HAART. Current HIV Research, v. 9, n. 4, p. 209-222, 2011.

WHO. UNAIDS Data, 2017. World Health Organization, 2018. Disponível em: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20170720_Data_book_2017_en.pdf. Acesso em: 30 jan. 2019.

WIESCH, J. S. ZUR *et al.* Comprehensive Analysis of Frequency and Phenotype of T Regulatory Cells in HIV Infection: CD39 Expression of FoxP3+ T Regulatory Cells Correlates with Progressive Disease. Journal of Virology, v. 85, n. 3, p. 1287-1297, 2011.

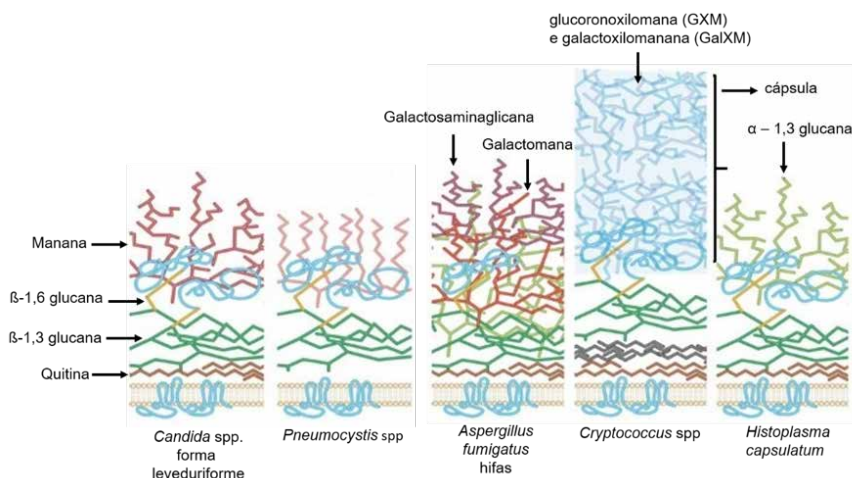
DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS

Amauri de Oliveira
Édina Starck
Gabriela Gonçalves de Oliveira

INTRODUÇÃO

Fungos são organismos eucariotas, classificados em seu próprio reino, o reino Fungi. De forma geral, apresentam uma parede celular rígida composta de quitina, glicana e uma membrana plasmática em que o ergosterol (esterol) é o principal componente que substitui o colesterol, como se observa na Figura 1. (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

Figura 1: Estrutura da parede celular comum a fungos patogênicos

Fonte: Gow; Latge; Munro (2017) – adaptada.

* Componentes estruturais presentes em diversos fungos patogênicos.

A Micologia Médica é o ramo da Microbiologia que estuda os fungos, geralmente microscópicos, agentes de infecções conhecidas como micoses, expressão utilizada pela primeira vez, em 1856, por Rudolf Virchow (1821-1902) (Lacaz; Porto; Martins, 1991).

Fungos são organismos ubíquos, os quais degradam matéria orgânica e podem existir como saprófitos, simbiontes, comensais ou parasitas. O interesse em seu estudo emergiu nas últimas décadas devido ao grande contingente de indivíduos imunossuprimidos ou hospitalizados com doenças de bases graves (Lacaz; Porto; Martins, 1991).

Os fungos e seus metabólitos interessam à Medicina sob vários aspectos, por exemplo: a) como agentes relacionados a micoses, com quadros clínicos que variam de assintomáticos a graves; b) como agentes de hipersensibilidade imediata ou tardia; c) como agentes de micetismo (intoxicação provocada pela ingestão de fungos macroscópicos); e d) como agentes de micotoxicoses, ou seja, a ingestão contínua e prolongada de alimentos que contenham micotoxinas como as aflatoxinas, cujas ações carcinogênicas e nefrotóxicas têm sido descritas na literatura (Lacaz; Porto; Martins, 1991).

A classificação taxonômica de fungos é baseada em sua morfologia e formação de esporos, além de outras características estruturais, bioquímicas e moleculares, cada vez mais compreendidas e consideradas. Fungos podem ser uni ou multicelulares e de forma mais simplificada, em termos de identificação morfológica, se apresentam como leveduras e fungos filamentosos. Sua forma de reprodução pode ser sexuada ou assexuada. Leveduras reproduzem-se por brotamento ou fissão, caracterizadas por formato redondo/oval ou estruturas alongadas – pseudohifas. Elas são unicelulares e produzem colônias redondas e mucoides em meios de cultura. Fungos filamentosos são organismos multicelulares, caracterizados por formas de hifas, as quais podem ser septadas, apresentar poucos septos ou ser asseptadas. A reunião de diversas hifas constitui o micélio, e suas colônias são descritas como filamentosas, aveludadas ou algodonosas. Hifas podem produzir estruturas conhecidas como conídios (estrutura de reprodução assexuada), os quais são facilmente dispersos pelo ar, funcionando inclusive como forma infectante (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

Uma característica importante tanto do ponto de vista de patogenicidade como de identificação é a presença do dimorfismo que alguns fungos apresentam, podendo ser inclusive ligado a alterações de temperatura (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

Os fungos podem apresentar respiração aeróbia, anaerobiose facultativa ou serem estritamente anaeróbios. Seu metabolismo é heterotrófico e os mesmos são bioquimicamente versáteis na produção de vários compostos, como por exemplo: ácido cítrico, etanol e glicerol (metabólitos primários) e metabólitos secundários, como: antibióticos amanitenos e aflatoxinas. Seu crescimento pode ser lento e dentre milhares de espécies, poucas centenas podem efetivamente causar doença em humanos, como se apresenta na Tabela 1 (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

Tabela 1: Gêneros de fungos mais prevalentes e de importância clínica

Taxonomia	Gêneros	Doenças em humanos
Classe: Zigomicetos		
Ordem: Mucorales, Entomophtorales	*Rhizopus, Mucor, Absidia, Saksenaea, Basidiobolus, Conidiobolus*	Mucormicose: oportunista em pacientes imunossuprimidos inclusive por desnutrição. Infecções subcutâneas e gastrointestinais
Classe: Basidiomicetos	*Teleomorfos de Cryptococcus, Malassezia e espécies de Trichosporon*	Criptococose e numerosas micoses
Classe: Arquiascomicetos	*Pneumocystis jirovecci*	Pneumonia/ imunossuprimidos
Classe: Hemiascomicetos	*Teleomorfos espécies de Candida; Saccharomyces*	Numerosas micoses
Classe: Euascomicetos		
Ordem: Onygenales	*Arthroderma (teleomorfos de Trichophyton e Microsporum); Ajellomyces (teleomorfos de espécies de Blastomyces e Histoplasma)*	Dermatofitoses; micoses sistêmicas
Ordem: Eurotiales	*Teleomorfos de espécies de Arpergillus*	Aspergilose
Ordem: Hypocrealues	*Teleomorfos de espécies de Fusarium*	Ceratite e outras micoses invasivas
Ordem: Microascales	*Pseudallescheria (teleomorfo de espécies de Scedosporium)*	Pneumonia, micetoma e micoses invasivas

Outra forma didática de classificação para o estudo de micoses é sua divisão em locais anatômicos afetados, como micoses superficiais, micoses cutâneas, micoses sistêmicas e micoses oportunistas (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

A resposta imune contra fungos envolve neutrófilos e macrófagos, os principais mediadores da imunidade inata. Pacientes com imunodeficiência inata são suscetíveis a infecções por fungos oportunistas. O reconhecimento fúngico pelas células imunes ocorre por meio de receptores TLRs (*Toll like*) e do tipo lectina. Os fagócitos produzem inúmeros peptídeos fungicidas além da liberação clássica de enzimas lisossomais e morte por meio de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Mais recentemente, tem-se compreendido o

papel do ATP na modulação da resposta inflamatória como uma alarmina em diversas doenças infecciosas e não infecciosas. (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015).

A imunidade celular é o principal mecanismo de imunidade adaptativa contra infecções fúngicas. Muitos fungos extracelulares provocam fortes reações T_H17, impulsionadas em parte pela ativação de células dendríticas, pela ligação de glucanas fúngicas à dectina-1, um receptor para este polissacarídeo fúngico. As células dendríticas ativadas produzem citocinas indutoras de T_H17, como IL-6 e IL-23. As células T_H17 estimulam a inflamação e recrutamento de fagócitos. Os indivíduos imunodeficientes, com respostas T_H17 defeituosas, são suscetíveis a infecções, como candidíase mucocutânea crônica. As respostas T_H1 são protetoras em infecções fúngicas intracelulares, como a histoplasmose, mas essas respostas podem provocar a inflamação granulomatosa, que é uma importante causa de lesão tecidual no hospedeiro. Fungos também induzem respostas específicas de anticorpos que podem ser protetoras (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015).

Mesmo fungos superficiais, os quais são pouco patogênicos, podem inibir a ativação do sistema imune por meio de indução de liberação da citocina IL-10, como é o caso das propriedades imunossupressoras de mananas como responsáveis pela cronicidade da dermatofitose por *Trichophyton rubrum* (Criado *et al.*, 2011). Já cepas mais patogênicas de *Cryptococcus neoformans* inibem a produção de citocinas, tais como o TNF e a IL-12 por macrófagos, estimulam a produção de IL-10, inibindo a ativação dos macrófagos (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015).

Pessoas com o sistema imune em bom funcionamento apresentam resistência e resposta imune inata e adaptativa às infecções fúngicas, mesmo ao serem constantemente expostos às formas infecciosas de diversos fungos presentes como parte da microbiota normal ou no ambiente externo (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

Algumas infecções fúngicas podem causar doença mesmo em hospedeiros saudáveis, como a micose sistêmica paracoccidioidomicose, mas, mesmo nestes casos, existem polos de apresentações clínicas, as quais variam em função do padrão de resposta imune celular, representada por linfócitos $TCD4^+$ T_H1, T_H2, T_H9 e T_H17 (Shikanai-Yakuda *et al.*, 2017).

Também existe interesse no estudo dos fungos em relação à agricultura, aquicultura entre outros. Economicamente, podem existir perdas significativas

em alimentos contaminados com teores altos de micotoxinas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC 07, de 2011, regulamenta, baseado em padrões internacionais, os níveis máximos dessas toxinas, sobretudo, em grãos e em uma grande variedade de alimentos destinados ao consumo humano e animal, como aflatoxina M1, aflatoxina B1, B2, G1, G2, Ocratoxina A, Desoxinivalenol, Fumonisinas (B1 + B2), Zearalenona e Patulina (ANVISA, 2011).

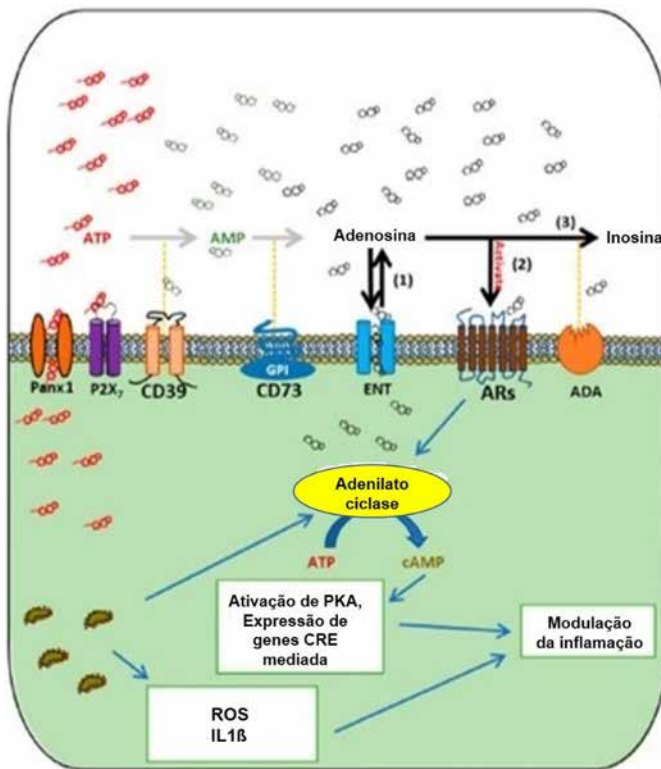
Como observado, a importância da interação fungo-hospedeiro é significativa e justifica que novas pesquisas clareiem os mecanismos de patogenicidade, evasão, diagnóstico, cultivo entre outros. Com este intuito, apresentam-se, neste capítulo, algumas informações acerca da sinalização purinérgica em fungos.

Fungos e sistema purinérgico: sinalização purinérgica em infecções fúngicas

O ATP apresenta um importante papel na transferência de energia química, o qual direciona inúmeros processos biológicos. Além disso, funciona como molécula de sinalização extracelular em muitos processos presentes em células eucarióticas de maneira conservada, conhecido com sinalização purinérgica (Lee; Yilmaz, 2018).

Em diversas infecções microbianas, tem sido demonstrado o que também é válido para infecções fúngicas: a liberação do ATP extracelular, que também pode ser considerado uma alarmina, ou DAMP (padrão molecular associado ao dano), sofre hidrólise por enzimas de superfície do hospedeiro, como a ENTPD1 (*ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1*), ou CD39 e da CD73 (*ecto-50-nucleotidase*; NT5E) em adenosina monofosfato e adenosina respectivamente, a qual pode ser transportada por famílias de transportadores entre o meio intracelular e extracelular, e que sofre modulação em eventos inflamatórios e por isquemia por exemplo. A adenosina ativa receptores, como A1, A2A, A2B e A3, e a resposta resultante dependerá da concentração extracelular destes receptores, e a modulação inclusive por patógenos envolvidos em processos de doenças (Lee; Yilmaz, 2018).

Após a ativação da adenilato ciclase, a adenosina é capturada para o meio intracelular, processo orquestrado por ENT1 e 2 (*equilibrative nucleoside transporter*), como mostra a Figura 2 (Lee; Yilmaz, 2018).

Figura 2: Relação do ATP como DAMP e resposta do hospedeiro perante infecções microbianas, incluindo as fúngicas

Fonte: Lee; Ylmaz (2018) – adaptada.

* Hidrólise sucessiva do ATP e ativação de eventos intracelulares com ativação de proteína quinase A (PKA), elementos de resposta à CAMP (CRE), produção de mediadores inflamatórios e modulação da inflamação.

A inibição de ENT por dipiridamol demonstrou uma reduzida produção de ROS por neutrófilos, o que pode constituir um alvo para minimização de danos em alguns tipos de doenças inflamatórias não infecciosas (Lee; Yilmaz, 2018).

A descrição do sistema purinérgico em leveduras e fungos em geral vem ocorrendo há décadas, a exemplo da levedura não patogênica *Saccharomyces cerevisiae*, a qual apresenta NTPDases ligadas a membrana e todos os ACRs (*apyrase conserved regions*) que são capazes de hidrolisar NTPs e NDPs (nucleosídeos trifosfatados e difosfatados respectivamente). Essas enzimas estão envolvidas nos processos de glicosilação associados ao sistema de Golgi. Evolucionariamente são mais relacionadas às NTPDases 4, 5, 6 e 7 dos mamíferos, as quais estão localizadas no citoplasma. A atividade NTPDase de superfície foi mais recentemente descrita para leveduras patogênicas de *Cryptococcus neoformans*. A atividade de NTPDase foi estimulada pelo Mg2+ e mostrou altas taxas de hidrólise de ATP, ITP, GTP, CTP e UTP, mas não de ADP. Contudo, mais estudos são necessários para predizer a localização exata dos complexos enzimáticos, como a família CD39/NTPDase 1. A atividade ectoATPase também foi demonstrada recentemente para o patógeno *Fosecaea pedrosoi*, o qual causa cromoblastomicose crônica, uma micose subcutânea (Sansom; Robson; Hartland, 2008).

Para elucidar os mecanismos de efluxo de ATP, modelos experimentais utilizam fungos como *Saccharomyces cerevisiae*, pela conveniência e facilidade de manipulação. Um estudo com *S. cerevisiae* e seus mutantes ou cepas manipuladas geneticamente identificou diversos processos que regulam os níveis de ATP extracelular, incluindo translação mitocondrial e formação de endossomos. O trabalho relacionou vias de sinalização as quais incluem o complexo TOR (TORC1), aminoácidos entre outros necessários para a regulação do efluxo de ATP, o que pode abrir perspectivas no entendimento do mesmo mecanismo em células eucariotas superiores (Junior *et al.*, 2008; Peters *et al.*, 2016).

Resposta purinérgica em infecções oportunistas

A elucidação de mecanismos moleculares referentes à resposta imune é extremamente importante, sobretudo, quando se trata do manejo de infecções por micoses oportunistas, como o caso da candidíase por *Candida glabrata*,

agente de alta prevalência em infecções hospitalares, e, em conjunto com outras espécies de *Candida spp.*, representa índices de mortalidade próximos a 50% em pacientes com sepse (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Linhagens de macrófagos J774 infectados com patógenos comuns, tais como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e *Candida glabrata*, foram analisados em relação à ativação de receptores P2X7 e sua relação com o fluxo de cálcio e ATP. Os resultados demonstraram que o receptor P2X7 atua como *scavenger* na fagocitose das bactérias, mas não de *Candida glabrata*, mediado por cálcio. A fagocitose do fungo é mediada pelas adesinas Epa1, Epa6 e Epa7. Sob o ponto de vista terapêutico, é fundamental o conhecimento da ativação de tais receptores para o desenvolvimento de futuros fármacos (Perez-Flores *et al.*, 2016).

Candida albicans, apesar de fazer parte da microbiota normal do ser humano, pode causar doença e é um importante problema de saúde pública, principalmente, em pacientes imunossuprimidos e submetidos a procedimentos invasivos. No caso da invasão deste micro-organismo, sabe-se que o ATP é liberado para o meio extracelular, atuando como uma alarmina, enquanto a adenosina tem um efeito contrário, funcionando como um sinal regulador do sistema imune. Cardoso (2013), com o objetivo de avaliar a dinâmica da infecção por *C. albicans* e por meio da linhagem de macrófagos de ratos (RAW 264.7), procedeu a infecção experimental e observou que o ATP não interfere no processo de internalização fúngica, pois esta é igual tanto na presença como na ausência de ATP extracelular (adição de apirase). Foi demonstrado que existe um aumento de ATP extracelular em resposta à presença de *C. albicans*, podendo iniciar uma resposta inflamatória pelos macrófagos, no entanto estes não dependem do ATP para iniciar a defesa contra *C. albicans*, o que pode ser ativada por outras vias.

A criptococose é causada pelo fungo encapsulado, *Cryptococcus neoformans*. A sintomatologia clínica varia desde infecção assintomática, broncopneumonia leve até infecção do sistema nervoso central. A forma mais grave e comum é a criptococose pulmonar. Caso os macrófagos alveolares não consigam conter a infecção, esta pode evoluir para meningite ou encefalite. O espectro clínico da doença, o qual implica resistência ou suscetibilidade, depende também do envolvimento do sistema purinérgico. A infecção experimental de ratos com *C. neoformans* demonstrou uma resposta característica do sistema purinérgico frente a infecção, com aumento de níveis de ATP extracelular, caracterizando

uma resposta pró inflamatória, seguido de episódios de modulação anti-inflamatória com alterações dos níveis de adenosina, redução de ácido úrico e aumentos dos níveis de inosina e xantina (Azevedo *et al.*, 2016).

Mecanismo de morte celular via modulação de ATP

Um mecanismo de lise microbiana envolvendo o sistema purinérgico associado à imunidade inata bem-estabelecida ocorre por meio de moléculas chamadas histatinas. Esses peptídeos catiônicos se ligam a sítios específicos na membrana de patógenos o que resulta em perda seletiva de íons e pequenas moléculas, principalmente o ATP. Um exemplo é o peptídeo salivar histatina 5 (Hst 5). Ele se liga às proteínas da parede celular de *Candida albicans*, identificadas como Ssa1/2, as quais são da família das proteínas de choque térmico 70 (Hsp70). Esta ligação promove um rápido efluxo de ATP, NAD+, AMP, ADP e íons, promovendo a morte desse fungo (Vylkova; Sun; Edgerton, 2007).

Envolvimento do sistema purinérgico em respostas mediadas por alérgenos

A resposta alérgica a alérgenos respiratórios é um tipo de resposta complexa. Os modelos de hipersensibilidade I e II perpassam esse processo, além de descobertas sempre atuais de novas células e moléculas descritas desde a classificação inicial por Coombs e Gell (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015).

A IL-33, membro da família de citocinas IL-1, foi descrita recentemente como participante das respostas TH2, as quais estão envolvidas na asma. Experimento em camundongos, com utilização de antígenos ambientais comuns, como o fungo *Alternaria alternata*, demonstrou aumento da liberação de IL-33 no lúmen das vias aéreas seguida por resposta de linfócitos inatos polarizados para a resposta TH2. A exposição a alérgenos também induz a liberação de ATP, o que sustenta o aumento intracelular de cálcio e liberação de IL-33 por meio da ativação de receptores purinérgicos P2 (P2Y2 e P2X7). A inibição farmacológica dos receptores P2 ou a deficiência do gene P2Y2 suspendeu a liberação de IL-33 neste modelo experimental, demonstrando a importância

da sinalização purinérgica no trato respiratório e a criação de possíveis fármacos no sentido de minimizar as respostas TH2 na asma (Kouzaki *et al.*, 2011).

Posteriormente, O'Grady e colaboradores (2013) realizaram experimentos semelhantes com células epiteliais brônquicas de doadores humanos. Neste trabalho, as células foram tratadas previamente com um composto quelante de cálcio, o qual significativamente inibiu a liberação de ATP, demonstrando dependência. Comparativamente, a exposição das células ao fungo *Alternaria*, provocou uma liberação maior de ATP em pacientes asmáticos e a utilização de bloqueadores como BAPTA-AM e bafilomicina reduziram não somente o aumento de ATP, mas também sua exocitose.

Inibição de transportadores de purinas como alvo farmacológico

O entendimento do mecanismo de transporte de purinas pode ser útil no planejamento racional de novos alvos farmacológicos contra fungos patogênicos. Gavriil e colaboradores (2018), a partir de estudos genéticos e bioquímicos a respeito da presença de transportadores altamente específicos de nucleotídeos, descrevem a presença de quatro tipos: NAT (*Nucleobase cation symporters 2*), UapA/C – transportadores específicos de ácido úrico e xantina, em que AzgA são específicos para adenina-hipoxantina-guanina e o NSC1 (*Nucleobase cation symporters*), contendo subtipos como Fcy ou específico para adenina--hipoxantina-guanina-citosina e o *Fur-like*, específico para uracila, alantoína. A aspergilose é causada por membros do gênero *Aspergillus*, os quais podem causar reações alérgicas em hospedeiros hipersensíveis, doença pulmonar invasiva e formas disseminadas em indivíduos com imunossupressão. A maioria das infecções em humanos é causada por: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. terréus* externo (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

Todos os fungos filamentosos incluindo a maioria dos patógenos, como *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*, possuem todos os quatro subgrupos, além de vários tipos de leveduras. Foram identificados sete novos compostos com alta afinidade para o sítio de ligação FcyB. De forma significativa, três destes também demonstraram inibir o transportador AzgA. Este trabalho demonstrou que a inibição farmacológica específica de alvos de purinas pode ser interessante do ponto de vista terapêutico (Gavriil *et al.* 2018).

Relação entre a ação das micotoxinas e o sistema purinérgico

A indústria da aquicultura envolve grandes gastos com a alimentação de peixes, o que pode chegar a 40-50% do custo total de produção. Durante este processo, os peixes podem ser expostos a aflatoxina B1, metabólito secundário de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, o que pode exercer grande impacto na saúde animal e humana. Realizou-se um estudo com peixes de água doce, da espécie *Rhamdia quelen*, ou mais conhecido como Jundiá de água doce, com o objetivo de avaliar a ação do sistema purinérgico mediante dieta contaminada com AFB1. Verificou-se um decréscimo na atividade das NTPDases e aumento da atividade da adenosina deaminase em linfócitos esplênicos dos animais expostos. Logo, a participação do sistema purinérgico no processo de imunotoxicidade foi verificado e deve ser levado em conta quando se pensa em avaliação de toxicidade (Baldissera *et al.*, 2018).

Utilização de produtos à base de fungos e sinalização purinérgica

A utilização de produtos naturais é amplamente difundida. Extratos medicinais do fungo *Antrodia cinnamomea* têm sido utilizados como tônicos por tribos e população de Taiwan e outras localidades na Ásia. O extrato alcóolico demonstra propriedades anti-hipertensivas, antioxidativas, anti-inflamatórias, imunomodulatórias e anticancerígenas em culturas de células de mamíferos. Estudos *in vitro* com macrófagos humanos estimulados com LPS e extrato alcóolico do fungo demonstraram inibição da secreção de IL1-ß induzida por ATP; inibição de IL-18, TNF-α, transcrição de genes para ativação de caspase-1, NLRP3 e do receptor purinérgico P2X7R, além de inibir também a produção de ROS mediada por caspase-1. Outras vias investigadas foram a MAPK e NF-Kb. Os estudos sugeriram que este fungo representa um grande potencial como medicamento anti-inflamatório (Huang *et al.* 2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos acerca da presença de receptores do sistema purinérgico e ectonucleotidases em fungos vêm sendo realizado há cerca de três décadas. No entanto, a compreensão da ativação deste sistema e a complexa relação fungo-hospedeiro, seja em animais ou homens, ainda está no início de sua trajetória. O envolvimento do sistema purinérgico na resposta imune tem sido elucidado aos poucos e hoje se sabe que o delicado balanço entre resistência e suscetibilidade às infecções por fungos oportunistas, por exemplo, depende da ativação e modulação do sistema purinérgico por ambos os atores deste processo. A importância do estudo do sistema purinérgico não se restringe apenas a processos patogênicos e criação de novos fármacos com potencial terapêutico, mas também tem sua relevância econômica para alimentação humana e animal e potencial nutracêutico a ser melhor explorado.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A, K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), RDC 7 DE 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. Acesso em: 10 abr. 2019.

AZEVEDO, M. I.; FERREIRO, L.; SILVA, A. S.; TONIN, A. A.; MONTEIRO, D. U.; CASALI, E. A.; MORITZ, C. E. J.; SCHIRMBECK, G. H.; CARDOSO, V. V.; FLORES, M. M.; FIGHERA, R.; STEFANI, L. M.; SANTURIO, J. M. Participation of purines in the modulation of inflammatory response in rats experimentally infected by Cryptococcus neoformans. Microbial Pathogenesis, v. 99, p. 36-40, 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401015301674?via%3Dihub. Acesso em: 08 abr. 2019.

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; ZEPPENFELD, C. C.; GARZON, L. R.; DESCOVI, S. N.; SILVA, A. S.; STEFANI L. M.; Baldisserotto, B. Purinergic signalling displays a pro-inflammatory profile in spleen and splenic lymphocytes of Rhamdia quelen fed with a diet contaminated by fungal mycotoxin: Involvement on disease pathogenesis. Microbial Pathogenesis, p. 123, p. 449-453, 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088240101831115X?via%3Dihub. Acesso em: 15 abr. 2019.

CARDOSO, T. S. Papel do ATP na infeção de macrófagos por Candida albicans. Dissertação. FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA.

UNIVERSIDADE DE COIMBRA, PORTUGAL, p. 1-54, 2013. Disponível em: https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/26087/1/Tese_Tom%C3%A9%20Silva%20Cardoso.pdf. Acesso em: 10 abr. 2019.

CRIADO, P. R.; OLIVEIRA, C. B.; DANTAS, K. C.; TAKIGUTI, F. A.; BENINI, L. V., VASCONCELLOS, C. Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. An Bras Dermatol. v. 86(4), p. 726-31, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/abd/v86n4/v86n4a15.pdf. Acesso em: 10 abr. 2019.

GAVRIIL, E-S.; DIMITRAKIS, S.; PAPADAKI, G.; BALASKA, S.; LAMBRINIDIS, G.; LOUGIAKIS, N.; MARAKOSM P.; DIALLINAS, G.; POULI, N.; MIKROS, E. Structure-activity relationships in fungal nucleobases transporters as dissected by the inhibitory effects of novel purine analogues. European Journal of Medicinal Chemistry, v.156, p. 240-251, 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523418305294?via%3Dihub. Acesso em: 14 abr. 2019.

GOW, N. A. R.; LATGE, J. P.; MUNRO, C. A., 2017. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. Microbiol Spectrum 5(3): FUNK-0035-2017. p. 1-25. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016. Disponível em: http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016. Acesso em: 04 abr. 2019.

HUANG, T. T.; PUWU, S.; CHONG, K. Y .; OJCIUS, D. M.; FEIKO, Y.; WU, Y. H.; WU, C. Y.; CHENLU, C.; MARTEL, J.; YOUNG, J. D.; CHIHLAI, H. The medicinal fungus Antrodia cinnamomea suppresses inflammation by inhibiting the NLRP3 inflammasome. Journal of Ethnopharmacology, v. 155 I1), p. 154-164, 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874114003791?via%3Dihub. Acesso em: 29 mar. 2019.

JÚNIOR, C. R. E.; DOHLMAN, H. G.; ADDISON, D. A.; CLAS, M. L.; LARAZOWSKI, E.; BOUCHER, R .C. Similarities between UDP-Glucose and Adenine Nucleotide Release in Yeast: Involvement of the Secretory Pathway. Biochemistry, v. 47, p. 9269-9278, 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2617775/pdf/nihms-72983.pdf. Acesso em: 17 mar. 2019.

KOUZAKI, H.; IIJIMA, K.; KOBAYASHI, T.; O'GRADY, S. M.; KITA, H. The Danger Signal, Extracellular ATP, Is a Sensor for na Airborne Allergen and Triggers IL-33 Release and Innate Th2-Type Responses. The Journal of Immunology, v. 186, p. 4375-4387, 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062674/pdf/nihms277960.pdf. Acesso em: 25 fev. 2019.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Micologia Médica. Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

LEE, J. S.; YILMAZ, Ö. Unfolding Role of a Danger Molecule Adenosine Signaling in Modulation of Microbial Infection and Host Cell Response. Int. J. Mol. Sci. v. 19 (199). p. 1-20, 2018. doi:10.3390/ijms19010199. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5796148/pdf/ijms-19-00199.pdf. Acesso em: 1º abr. 2019.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

O'GRADY, S. M.; PATIL, N.; MELKAMU, T.; MANIAK, P.; LANCTO, C.; KITA, H. ATP release and Ca2+ signalling by human bronchial epithelial cells following Alternaria aeroallergen exposure. J Physiol, v. 591(18), p. 4595-4609, 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3784201/pdf/tjp0591-4595.pdf. Acesso em: 08 abr. 2019.

PEREZ-FLORES, G.; HERNANDEZ-SILVA, C.; GUTIERREZ-ESCOBEDO, G.; DE LAS-PEÑAS, A.; CASTAÑO, I.; ARREOLA, J.; PEREZ-CORNEJO. P2X7 from J774 murine macrophages acts as a scavenger receptor for bacteria but not yeast. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 481 (1-2), p. 19-24, 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X16318824?via%3Dihub. Acesso em: 05 abr. 2019.

PETERS, T. W.; MILLER, A. W.; TOURETTE, C.; AGREN, H.; HUBBARD, A.; HUGHES, R. E. Genomic Analysis of ATP Efflux in Saccharomyces cerevisiae. G3 Genes/Genome/Genetics, v. 6. p. 161-170, 2016. doi: 10.1534/g3.115.023267. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4704715/pdf/161.pdf. Acesso em: 15 abr. 2019.

SANSOM, F.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Possible Effects of

Microbial Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases on Host-Pathogen Interactions. Microbiol Mol Biol Rev. v. 72(4). p. 765-81, 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2593569/pdf/0013-08.pdf. Acesso em: 15 mar. de 2019.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v. 50(4). p.1-26, 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822017000500715. Acesso em: 1º abr. 2019.

VYLKOVA, S.; SUN, J. N.; EDGERTON, M. The role of released ATP in killing Candida albicans and other extracellular microbial pathogens by cationic peptides. Purinergic Signalling, v. 3, p. 91-97, 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2096768/pdf/11302_2006_Article_9040.pdf. Acesso em: 03 abr. 2019.

SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE

Luciana Rocha Costa
Bruna de Barros Penteado
Fabiana Fonseca Zanoelo
Jeandre Augusto dos Santos Jaques

INTRODUÇÃO

A dengue consiste em uma doença infecciosa causada por um vírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, que possui quatro sorotipos diferentes – DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 – (Brasil, 2015) e que pode manifestar-se de forma assintomática ou sintomática.

Para eliminação de patógenos intracelulares, como o vírus da dengue (DENV), os nucleotídeos extracelulares, como o ATP e os seus produtos de hidrólise, podem agir como sinais de alerta para o reconhecimento e combate da infecção, constituindo um componente importante da resposta imune inata. Além disso, o ATP extracelular ao ativar o receptor purinérgico P2X7 (P2X7R) provoca a diminuição da proteína viral NS1, necessária para a replicação do vírus (Coutinho-Silva; Ojcius, 2012; Corrêa *et al.*, 2016).

Dengue

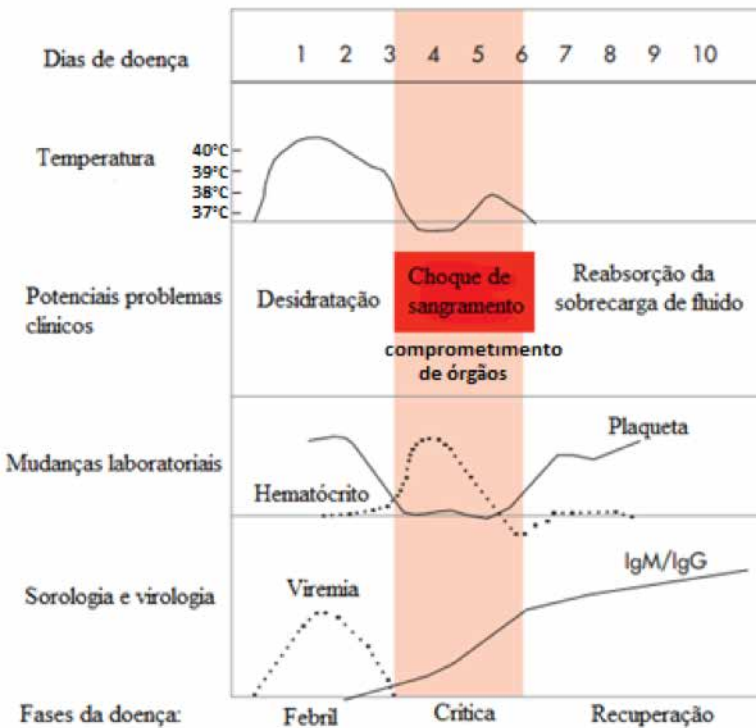
A dengue, que é uma doença infecciosa causada por um vírus da família *Flaviviridae*, possui genoma codificado na forma de RNA.

Durante o processo de replicação viral, ocorre a produção de uma poliproteína precursora, que é processada dando origem a proteínas estruturais formadoras do vírion, como o envelope (E), a membrana (prM/M) e o nucleocapsídeo (NC), constituído por um complexo de uma cópia do RNA de fita simples com múltiplas cópias da proteína do capsídeo (BYK) (Gamarnik, 2016).

O vírus é formado também por sete proteínas não estruturais identificadas como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Dentre as proteínas virais, as que mais influenciam na infecção e na virulência do DENV são: a proteína E, por ser responsável por facilitar a endocitose nas células do hospedeiro; a proteína NS1, devido a sua capacidade de inibir ou contornar a via clássica do sistema complemento; e as não estruturais. A NS2B, por existir indícios de que atua como cofator ativador da NS3, a qual, por sua vez, atua como protease, hidrolisando as junções NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A e NS4B-NS5, para que a replicação e a maturação do vírus possam ocorrer, fazendo com que esta enzima seja um potencial alvo para drogas antivirais (Byk; Gamarnik, 2016; Xie et. al., 2017). A proteína NS2A atua na montagem do vírus, auxiliando na produção de partículas virais que constituem sua membrana (Leung et. al., 2008). A proteína viral NS4A induz o rearranjo da membrana da célula infectada e participa como um dos componentes do complexo de replicação (Lee *et al.*, 2015). Já a proteína NS4B apresenta uma estrutura N-terminal (peptídeo 2k), que guia a proteína localizada no retículo endoplasmático. Quando a NS4B está ligada ao retículo endoplasmático, o peptídeo 2k se desprende, funcionando como um sinal para que o complexo NS2B/NS3 seja ativado (Xie *et al.*, 2017). Por fim, a NS5 apresenta atividade de polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp), influencia diretamente a replicação, a amplificação e, e a carga viral. A atuação dessas proteínas influencia na virulência do DENV e nos sintomas que a doença pode manifestar (Xie et. al., 2017).

Dessa forma, a dengue pode se manifestar de forma assintomática ou sintomática. Na sua forma sintomática, provoca uma doença sistêmica com espectro clínico amplo, que possui três fases clínicas: febril, crítica e de recuperação (Figura 1). Na fase febril, o indivíduo apresenta aumento na viremia entre o 1º e 2º dia de infecção, e febre geralmente alta (39°C a 40°C) de início abrupto, com duração de dois a sete dias, podendo ser acompanhada por cefaleia, mialgias, artralgias, dor retro orbitária, exantema, vômitos e diarreia. A fase crítica pode ocorrer após a diminuição da febre, com a crescente produção

de imunoglobulinas como IgG e IgM pelo organismo e o surgimento dos sinais de alarme: dor abdominal intensa; vômitos persistentes; acúmulo de líquidos; hipotensão postural; hepatomegalia; sangramento de mucosa; letargia; aumento progressivo do hematócrito; e plaquetopenia. Já na fase de recuperação, ocorre a reabsorção gradual do plasma extravasado com melhora progressiva do quadro (OMS, 2009; Brasil, 2016a).

Figura 1: Fases clínicas da dengue

Fonte: OMS (2009) – adaptada.

Importância epidemiológica

O Brasil enfrenta epidemias de dengue desde 1986 (Valle; Pimenta; Aguiar, 2016), sendo que atualmente os quatro sorotipos do vírus circulam no país.

O vetor da doença é o mosquito *Aedes aegypti* (Brasil, 2016b), que também transmite outras duas arboviroses – zika e chikungunya –, que possuem extrema importância para a saúde pública, pois apresentam sintomas semelhantes e levam a uma situação preocupante pelo crescente número de casos graves e óbitos nos últimos dez anos (Brasil, 2016a).

Além disso, tem-se verificado um aumento da incidência das formas mais graves e atípicas destas doenças, como registros de manifestações neurológicas e microcefalias. Destaca-se, então, a importância dessas doenças como um caso de emergência na saúde pública nacional e internacional (Brasil, 2016b).

No Brasil, o padrão epidemiológico tem se diversificado com o passar do tempo, sendo que inicialmente a sua forma clássica atingia principalmente adultos jovens, porém a partir de 2007 foi verificado o aumento da incidência das formas graves, principalmente em crianças. Acredita-se que fatores como a circulação simultânea dos quatro sorotipos virais e a dificuldade no controle da proliferação do vetor sejam cruciais para o cenário de transmissão endêmica e epidêmica instalado em grande parte do país. Além disso, a dengue ocorre principalmente entre os meses de outubro a maio, demonstrando comportamento sazonal (Brasil, 2015).

Fisiopatologia

A mortalidade da dengue está relacionada com as alterações celulares observadas na doença, o que demonstra a necessidade de intervenção terapêutica com o objetivo de reduzir a mortalidade (Oliveira *et al.*, 2009).

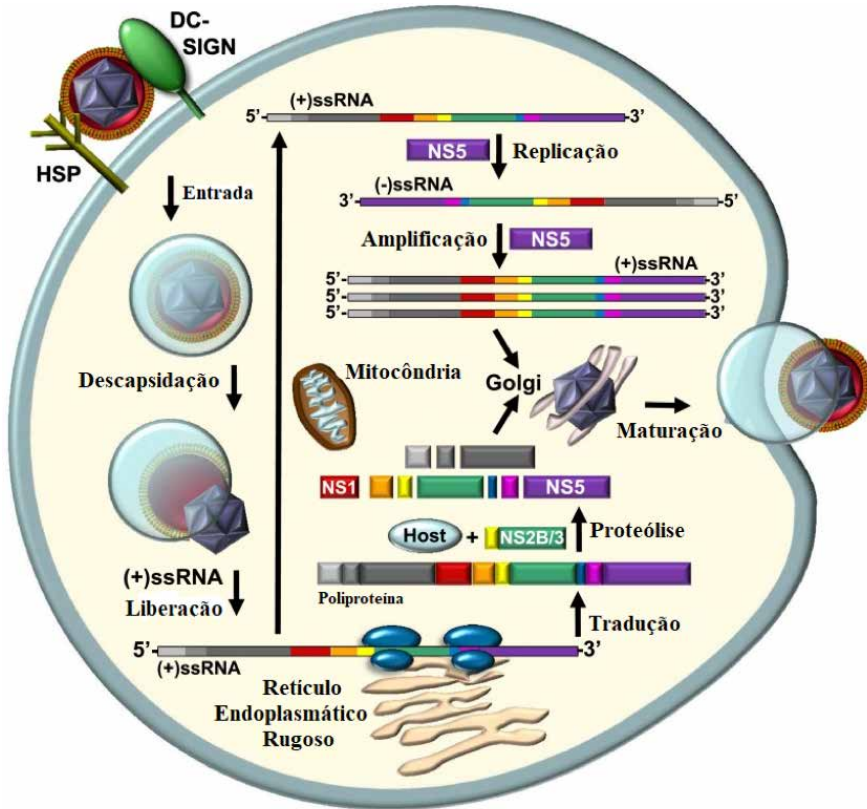
As manifestações hemorrágicas, por exemplo, ocorrem devido a alterações vasculares e a plaquetopenia. Essas hemorragias estão associadas à coagulopatia de consumo (coagulação intravascular disseminada) e a uma possível hipovolemia prolongada (Brasil, 2016a). Outras alterações hematológicas observadas são a leucopenia e a presença de linfócitos atípicos. Pode-se observar também a redução da contagem absoluta de linfócitos T CD8 e CD4, tanto durante a fase

aguda da doença quanto em período de recuperação, sendo que os linfócitos atípicos compreendem formas intermediárias de ativação devido a estímulos antigênicos virais (Oliveira *et al.*, 2009).

A plaquetopenia que ocorre na dengue pode relacionar-se com a interação indireta com o vírus, visto que as plaquetas têm a sua funcionalidade alterada devido à exposição aos mediadores secretados em resposta a infecção, como inteleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) (Oliveira, 2012).

Os pacientes infectados pelo DENV geralmente apresentam leucopenia e plaquetopenia associadas à hemorragia. Contudo, alguns pacientes apresentam hemorragia mesmo na ausência de plaquetopenia (Oliveira *et al.*, 2009), o que sugere que outros fatores podem estar relacionados à manifestação hemorrágica da dengue, como o comprometimento vascular, a disfunção plaquetária e os distúrbios da coagulação sanguínea.

Para o DENV ser internalizado na plaqueta, ele se liga à DC-SIGN (*Dendritic cell–specific intercellular adhesion molecule-3–grabbing nonintegrin*) e ao proteoglicano de heparan sulfato (HSP). Em seguida, seu genoma (+) ssRNA é liberado para o citosol e traduzido pelos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso através da síntese de uma poliproteína precursora, que sofre proteólise e gera as proteínas que constituirão novos vírus (Figura 2). O antígeno NS1, uma destas proteínas, que se encontra na superfície viral, é reconhecido pelo sistema imune e induz a produção de anticorpos que apresentam reatividade cruzada com plaquetas, o que pode contribuir com o processo de plaquetopenia. A poliproteína também pode agir como um modelo de replicação para NS5. As mitocôndrias facilitam a replicação e a tradução, juntamente com os remanescentes do complexo de Golgi, tornando possível a montagem dos *vírions* (Simon; Sutherland; Pryzdial, 2015).

Figura 2: Replicação e tradução do RNA do dengue vírus em plaquetas

Fonte: Simon, Sutherland e Pryzdial (2015) – adaptada.

* HSP, proteoglicano de heparan sulfato; DC-SIGN, receptor de lecitina de células dendríticas; ssRNA, RNA viral de fita simples.

Existem alguns parâmetros que são utilizados como marcadores precoces da gravidade da infecção pelo DENV, como a atividade aumentada da enzima lactato desidrogenase (LDH) e da enzima creatina quinase (CK), e os níveis elevados de proteína C-reativa (PCR) e redução na albumina sérica. O aumento da atividade enzimática dos marcadores pode indicar um aumento na lise

celular, e a PCR pode sinalizar uma infecção ou processo inflamatório agudo. Já a hipoalbuminemia é decorrente do extravasamento de plasma, que ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular com a liberação de mediadores vasoativos pelos monócitos infectados (Villar-Centeno *et al.*, 2013).

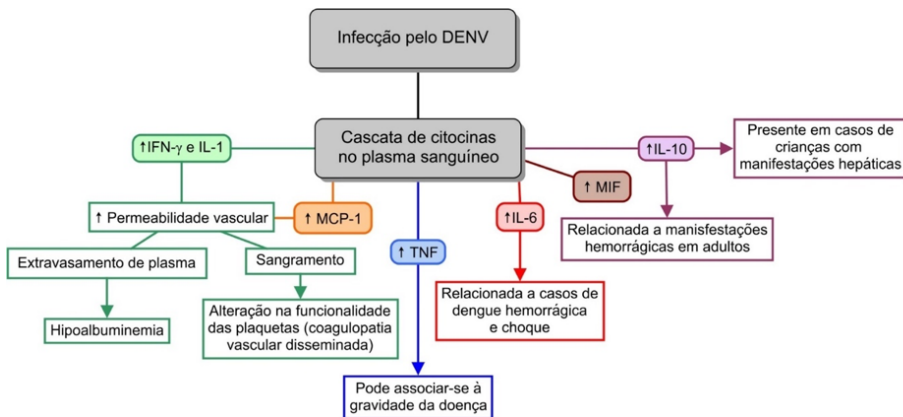
O endotélio forma a barreira primária do sistema circulatório; assim, a disfunção em suas células durante uma doença aguda pode afetar a permeabilidade vascular e causar extravasamento plasmático. No caso da dengue, vários fatores podem ocasionar esse quadro, como a apoptose de células endoteliais, e a expressão exacerbada de quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) por monócitos (Lee *et al.*, 2006).

Durante a fase aguda da dengue, os pacientes apresentam um aumento nos níveis plasmáticos de TNF, de interferon gama (IFN-γ) e do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF). Em crianças infectadas pelo vírus e com manifestações hepáticas, ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de IL-10, previamente relacionado a manifestações hemorrágicas em adultos, e também de interferon gama induzido por proteína 10 (CXCL10/IP-10) (Ferreira *et al.*, 2015).

No decorrer da infecção pelo DENV, a elevação do TNF pode estar associada à gravidade da doença, o IFN-γ e a interleucina 1 (IL-1) contribuem para o aumento da permeabilidade capilar, e a interleucina 6 (IL-6) se eleva em casos de dengue hemorrágica e choque (Corrêa *et al.*, 2016), como mostra a Figura 3.

Na fase aguda da dengue, os linfócitos T ativados produzem citocinas que possuem como função a eliminação do vírus, sendo que, após a infecção, grande parte desses linfócitos sofre apoptose (Torrentes-Carvalho *et al.*, 2014).

Durante a infecção de monócitos pelo DENV, ocorrem interações complexas com a célula hospedeira, desencadeando a ativação de fatores de transcrição, que induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF. Essas interações induzem não apenas a resposta pró-inflamatória, que influencia a progressão e a gravidade da doença, mas também a ativação de caspases e o aumento na expressão do receptor Fas desencadeando a cascata de sinalização da apoptose. A infecção pelo DENV poderia também ativar o fator de transcrição IRF-3, relacionado ao aumento de citocinas, como interferon tipo I, que atuaria inibindo a replicação viral (Torrentes-Carvalho *et al.*, 2009).

Figura 3: Fluxograma do envolvimento de citocinas na fisiopatologia da dengue

Fonte: autores (2019).

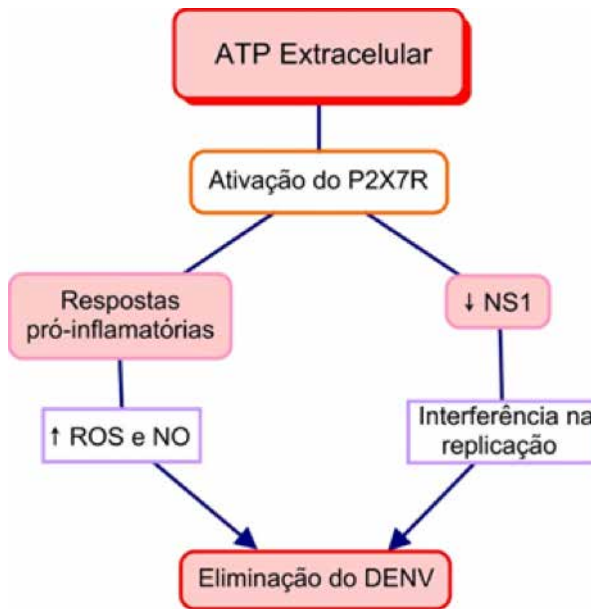
* IFN-γ: interferon gama; IL-1: interleucina 1; IL-6: interleucina 6; IL-10: interleucina 10; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1; MIF: fator de inibição de migração de macrófagos; TNF: fator de necrose tumoral.

Quando comparada a outras patologias infecciosas virais com quadro clínico semelhante, a dengue apresenta como um bom indicador para o diagnóstico diferencial a presença de no mínimo 10% de linfócitos atípicos no sangue periférico (Oliveira *et al.*, 2009).

Sinalização purinérgica

Através da ativação de receptores purinérgicos, os nucleotídeos extracelulares modulam várias funções teciduais como desenvolvimento celular, fluxo sanguíneo, secreção, inflamação e atividade imune. Os efeitos desses nucleotídeos parecem se sobressair quando atuam em conjunto com fatores de crescimento vascular, citocinas, moléculas de adesão e óxido nítrico (NO) (Robson; Sévigny; Zimmermann, 2006).

Durante o processo de eliminação de patógenos intracelulares, os nucleotídeos extracelulares, como o ATP e os seus produtos, agem como sinais de alerta no reconhecimento e controle de patógenos, constituindo um componente importante da resposta imune inata. O P2X7R de células do sistema imune, ativado pelo ATP, induz respostas pró-inflamatórias que envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e NO. Em cultura de células infectadas pelo DENV2, o ATP extracelular provoca, através da ativação do P2X7R, a redução dos níveis plasmáticos da proteína NS1, que é fundamental para o processo de replicação viral, como se verifica na Figura 4. (Coutinho-Silva; Ojcius, 2012; Corrêa *et al.*, 2016).

Figura 4: Fluxograma da influência do ATP extracelular na infecção por DENV

Fonte: autores (2019).

* NO: óxido nítrico; NS1: proteína não-estrutural 1; P2X7R: receptor P2X7; ROS: espécies reativas de oxigênio.

Os receptores purinérgicos são expressos em vários terminais nervosos (centrais e periféricos) e células sanguíneas (Burnstock; Brown, 1981). Nos vasos sanguíneos em condições fisiológicas, o ATP liberado de nervos simpáticos perivasculares excita o músculo liso por meio de receptores P2X, provocando vasoconstrição, enquanto que o ATP liberado das células endoteliais age nos receptores P2Y e em alguns receptores P2X, induzindo a liberação de NO que promove a vasodilatação, como mostra a Figura 5. (Burnstock, 2006; Yegutkin, 2008).

Figura 5: Fluxograma dos efeitos da sinalização purinérgica sobre o tônus vascular e a agregação plaquetária

Fonte: autores (2019).

O nucleotídeo ADP, liberado devido à lise e ativação plaquetária, é um dos mediadores do processo de agregação das plaquetas, pois promove através da ligação com receptores P2Y12 causa a ativação da integrina αIIbβ3 e do fator de Von Willebrand. (Figura 5) (Falcão *et al.*, 2013). Além de ser consideradas os principais mediadores da hemostasia e da geração de trombina, as plaquetas também possuem funções associadas à imunidade inata e adaptativa, como a produção e liberação de moléculas pró-inflamatórias (Semple; Italiano Jr.; Freedman, 2011). Em situações de injúria celular, como a infecção pelo DENV, essas funções plaquetárias promovem a ativação de células da resposta imune e o desequilíbrio da hemostasia.

Durante a infecção pelo DENV2, as vias de sinalização celular podem estar envolvidas na modulação da barreira endotelial através de alterações na expressão da enzima ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT; CD73). Experimentalmente, em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) infectadas pelo DENV2 ocorre um aumento da expressão de E-5'-NT até 72 h, mediado por interferon do tipo I. Após 72h, a redução da expressão da enzima está relacionada com a redução da função da barreira endotelial. Todas essas evidências são corroboradas pela função da enzima E-5'-NT, que catalisa a hidrólise do nucleotídeo AMP e gera como produto o nucleosídeo adenosina, que através de receptores purinérgicos do tipo P1, mantém a função de barreira das células endoteliais. Portanto, a redução da expressão da E-5'-NT e, consequentemente, a redução dos níveis de adenosina, pode contribuir para a progressão da infecção pelo vírus, o que torna possível o prolongamento da hipersensibilidade, além de favorecer o desenvolvimento de dengue hemorrágica (Patkar; Giaya; Libraty, 2013).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento acerca dos efeitos que os patógenos exercem sobre o sistema purinérgico do hospedeiro e a compreensão de seus mecanismos de defesa, que dependem da sinalização iniciada através da ativação de receptores purinérgicos durante o combate à infeção, é de grande valor para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas dirigidas ao sistema purinérgico (Coutinho-Silva; Ojcius, 2012).

Alguns estudos trazem informações valiosas acerca das alterações que ocorrem durante a infecção pelo DENV, como a redução dos níveis de proteínas virais importantes para a virulência através da ativação do P2X7R pelo ATP; e as alterações que ocorrem, durante a infecção pelo DENV2, na expressão da enzima E-5'-NT e, consequentemente, dos níveis de adenosina, importante para a regulação da função endotelial. Contudo, embora algumas características tenham sido desvendadas, ainda existe uma grande carência de estudos que investiguem o perfil do sistema purinérgico em infecções causadas pelo DENV.

Existe uma lacuna ainda maior com relação às outras arboviroses veiculadas pelo *Aedes aegypti*, como a zika e a chikungunya. Apesar de não serem doenças novas, todas se encontram no quadro das doenças negligenciadas.

Estudos investigativos da atividade e expressão das enzimas que regulam os níveis plasmáticos de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, os quais, através de receptores purinérgicos, regulam o tônus vascular, a resposta imune e outras funções importantes alteradas durante infecção pelo vírus da dengue, certamente, contribuirão para montar mais peças deste quebra-cabeça.

Portanto, ainda existe um horizonte a ser desbravado para compreender de forma mais completa a influência do sistema purinérgico durante a infecção pelo vírus da dengue.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano de Contingência Nacional para Epidemias de Dengue. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 42 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016a. 58 p.

BRASIL. Boletim Epidemiológico: Relatório da Reunião Internacional para Implementação de Alternativas para o Controle do Aedes aegypti no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2016b. 9 p.

BURNSTOCK, G.; BROWN, C. M. An introduction to purinergic receptors. *In*: BURNSTOCK, G. (ed.). Purinergic receptors. London: Chapmam and Hall, 1981. Cap. 1.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling. British Journal of Pharmacology, v. 147, p. S172-S181, 2006.

BYK, L. A.; GAMARNIK, A. V. Properties and functions of the dengue virus capsid protein. Annual Review of Virology, v. 3, p. 263-281, 2016.

CHAVES, S. P. *et al.* Modulation of P2X7 purinergic receptor in macrophages by Leishmania amazonensis and its role in parasite elimination. Microbes and Infection, v. 11, n. 10-11, p. 842-849, 2009.

CORRÊA, G. *et al.* The purinergic receptor P2X7 role in control of Dengue virus-2 infection and cytokine/chemokine production in infected human monocytes. Immunobiology, v. 221, p. 794-802, 2016.

COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D. M. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. Microbes and Infection, v. 14, n. 14, p. 1271-1277, 2012.

FALCÃO, F. J. A. *et al.* Receptores Plaquetários P2Y12: Importância na Intervenção

Coronariana Percutânea. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 101, n. 3, p. 277-282, 2013.

FERREIRA, R. A. X. *et al.* Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. Acta Tropica, v. 149, p. 138-147, 2015.

LEE, C. M. *et al.* Determinants of dengue virus NS4A protein oligomerization. Journal of virology, v.89, n.12, p.6171-6183, 2015.

LEE, Y. *et al.* MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. Journal of General Virology, v. 87, p. 3623-3630, 2006.

LEUNG, J. Y. *et al.* Role of nonstructural protein NS2A in Flavivirus assembly. American Society for Microbiology Journals, v. 82, n. 10, p. 4731-4741, 2008.

OLIVEIRA, E. C. L. *et al.* Alterações hematológicas em pacientes com dengue. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, n. 6, p. 682-685, 2009.

OLIVEIRA, D. B. de. Estudo das alterações morfológicas e funcionais das plaquetas na infecção pelo vírus dengue. Dissertação (Mestrado). Rio de Janeiro, 2012. 101 f.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control – New edition. Geneva, 2009.

PATKAR, C.; GIAYA, K.; LIBRATY, D. Dengue Virus Type 2 Modulates Endothelial Barrier Function through CD73. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 88, n. 1, p. 89-94, 2013.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signalling, v. 2, p. 409-430, 2006.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO JR., J. E.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. Nature Review – Immunology, v. 11, n. 4, p. 264-274, 2011.

SIMON, A. Y.; SUTHERLAND, M. R.; PRYZDIAL, E. L. G. Dengue virus binding and replication by platelets. Blood, v. 126, n. 3, p. 378-385, 2015.

TORRENTES-CARVALHO, A. *et al.* Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, n. 8, p. 1091-1099, 2009.

TORRENTES-CARVALHO, A. *et al.* Regulation of T lymphocyte apoptotic markers is associated to cell activation during the acute phase of dengue. Immunobiology, v. 219, p. 329-340, 2014.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; AGUIAR, R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 25, n. 2, p. 419-422, abr. 2016.

VILLAR-CENTENO, L. A. *et al.* Alteraciones bioquímicas como marcadores predictores de gravedad en pacientes con fiebre por dengue. Biomédica, v. 33, p. 63-69, 2013.

XIE, Q. *et al.* Structure and Function of the Non-Structural Protein of Dengue Virus and its Applications in Antiviral Therapy. Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 17, n. 3, p. 371-380, 2017.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1783, p. 673-694, 2008.

SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NA SEPSE

Vanessa Valéria Miron
Maria Rosa Chitolina Schetinger
Andréia Machado Cardoso

INTRODUÇÃO

A sepse representa uma condição inflamatória amplamente estudada devido à sua gravidade e abrangência. Não é de hoje que seu tratamento e sua prevenção estabelecem conexões com pesquisas no mundo inteiro na busca por mecanismos para melhor compreender a inflamação.

Esta é uma condição fisiopatológica que envolve a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e dano tecidual (Cinar *et al.* 2019). As infecções mais comumente associadas à sepse são a pneumonia (50% dos casos), a infecção intra-abdominal e a infecção urinária. Além destas, também há as infecções relacionadas a cateteres, abcessos de partes moles, meningites e endocardites (ILAS, 2017).

Muitos mecanismos são investigados nesta condição, e o sistema purinérgico parece ter um papel importante nas alterações causadas pela sepse. Todas as modificações citadas nesta pesquisa, tanto em nível enzimático, quanto de receptor e substrato, parecem estar envolvidas na disfunção de órgãos proveniente da sepse (Miron *et al.,* 2018).

Atualmente, a sepse ainda é um dos alvos principais de pesquisas, as quais parecem estar focadas no mecanismo de ação da condição e em métodos para serem utilizados na prevenção ou nos estágios iniciais (Miron *et al.,* 2018; Water *et al.,* 2019), pois uma vez instalada, é muito difícil reverter o quadro

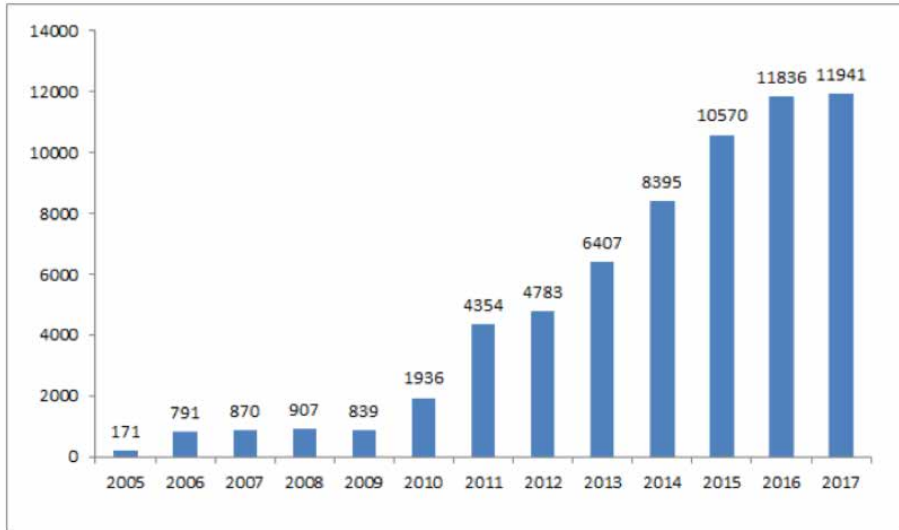
que a sepse proporciona. Este capítulo se propõe a apresentar as disfunções celulares causadas pela sepse, bem como os mecanismos envolvendo o sistema purinérgico e essa condição.

Sepse

A sepse é definida, atualmente, como disfunção de órgãos com risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção, ou seja, é uma condição que surge quando a resposta do organismo a uma infecção prejudica seus próprios tecidos e órgãos. Por vezes, essa infecção se localiza em apenas um órgão, mas gera uma resposta em todo o organismo tentando combater este agente infecioso e, assim, pode ocorrer o comprometimento de vários órgãos. Os tecidos mais atingidos são pulmões, cérebro, coração e fígado (Salles *et al.,* 1999; Singer *et al.,* 2016).

Essa resposta desregulada pode ocasionar morte do paciente por falência de múltiplos órgãos. No Brasil, a sepse ocupa 25% dos leitos nas UTI, constituindo-se a principal causa de morte nestas unidades. Além disso, a sepse é a principal causa de morte hospitalar tardia, superando o infarto do miocárdio e até o câncer. Segundo o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), a sepse pode chegar à mortalidade de 65% dos pacientes acometidos no Brasil, sendo que a média mundial está em torno de 30-40%. Em 2003, de acordo com o ILAS, ocorreram 398.000 casos e 227.000 mortes por choque séptico no Brasil, gerando um custo de R$ 17,34 bilhões em seu tratamento. Os pacientes que sobrevivem ficam, muitas vezes, com sequelas físicas, psicológicas e até mesmo cognitivas por longos períodos de tempo, necessitando ainda de cuidados especiais (ILAS, 2017; Singer *et al.,* 2016).

Com ajuda de *softwares* de banco de dados, o Instituto vem conseguindo agregar informações sobre a sepse no Brasil desde 2005 e conta com 130 instituições que enviam informações e dados para enriquecer sua base. Ao todo, mais de 60 mil pacientes acometidos de sepse e choque séptico foram incluídos nesse banco de dados desde o ano de início até 2017. A Figura 1 mostra a quantidade de pacientes incluídos por ano nestes registros.

Figura 1: Número de pacientes incluídos com sepse e choque séptico no software ILAS

Fonte: ILAS – Relatório Nacional (2017).

A manifestação da sepse ocorre por interação entre o micro-organismo infectante e as respostas imunes, inflamatórias e de coagulação do hospedeiro, pois a sepse é causada pela infiltração de bactérias gram-negativas e gram-positivas (Peppler *et al.*, 2016). Após a entrada no organismo humano, uma das toxinas liberadas pelas bactérias gram-negativas é o LPS (lipopolissacarídeo), principal endotoxina e componente lipídico da membrana externa dessas bactérias. Após as moléculas de LPS serem liberadas pela parede bacteriana, sua porção tóxica, o lipídio A, é exposta às células do sistema imunológico, gerando a resposta inflamatória (Peppler *et al.*, 2016; Salles *et al.*, 1999). A inflamação faz parte da resposta imune não específica e ocorre em resposta a qualquer tipo de lesão corporal (Ferrero-Miliani *et al.*, 2006).

Essa exposição ao LPS desencadeia uma cascata inflamatória, que é ativada tanto em tecido específico, quanto em nível sistêmico. Esse processo caracteriza-se pelo aumento de marcadores pró-inflamatórios, tais como as citocinas interleucina 1β (IL-1β) e interleucina 6 (IL-6), e pelo aumento da produção de espécies reativas (ER) (Peppler *et al.* 2016; Ferrero-Miliani *et al.*, 2006).

A IL-1 β é um membro da família da interleucina 1 (IL-1) e é produzida por quase todas as células nucleadas. A interleucina está entre os marcadores mais importantes de indução de resposta inflamatória, podendo desencadear febre, hipotensão e produção de citocinas, como a IL-6, que, por sua vez, além de também induzir febre, induz a síntese de proteínas hepáticas de fase aguda e estimula a síntese de moléculas de adesão em células endoteliais e leucócitos (Ferrero-Miliani *et al.*, 2006).

Por mais necessárias que sejam essas citocinas para induzir a resposta inflamatória, sua produção excessiva pode causar uma instabilidade hemodinâmica, característica em pacientes com sepse. Além disso, essa produção elevada também está associada à gravidade da resposta inflamatória, que, juntamente com a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, pode levar à falência de múltiplos órgãos (Lin *et al.,* 2000; Heitrich *et al.,* 2016).

Existem outros mecanismos que desencadeiam a sepse em modelo experimental. Além da administração do LPS, outro mecanismo muito utilizado e considerado o mais fidedigno é o método de punção e ligadura cecal (CLP). As infecções intra-abdominais são responsáveis por 20% dos casos de sepse, com mortalidade de até 60%. O ceco contém inúmeras bactérias, e sua punção resulta em peritonite polimicrobiana, translocação de bactérias para o sangue (bacteremia), choque séptico, disfunção de múltiplos órgãos e, por fim, morte (Siempos *et al.*, 2014).

O sistema imune é um dos primeiros a serem atingidos pela sepse. No primeiro estágio, quando ocorre a desordem do sistema, os linfócitos e outras células são atingidos, e a apoptose é induzida. Isto também colabora com a disfunção de múltiplos órgãos. No segundo estágio, devido à diminuição no número de linfócitos, ocorre a imunossupressão, que é maior causa de morte na sepse (Lin *et al.,* 2000; Heitrich *et al.,* 2016).

Devido a essas complicações no sistema imune, algumas pesquisas têm focado no sistema purinérgico, visto que esses sistemas estão interligados por uma série de mecanismos regulatórios, tais como indução de secreção de citocinas e sinalização de células imunes (Miron *et al.,* 2018). Inúmeras pesquisas foram e estão sendo desenvolvidas com os componentes deste sistema (enzimas, nucleotídeos, receptores) na tentativa de desvendar os mecanismos da condição da sepse. Apresentam-se aqui algumas destas pesquisas que possuem resultados promissores na tentativa de combater a sepse.

O sistema purinérgico e a sepse

O sistema purinérgico modula a inflamação, a coagulação e as respostas imunes e, devido a isso, esse sistema tem sido investigado na sepse (Vuaden *et al.* 2007; Savio *et al.*, 2017; Miron et al,. 2018). As pesquisas são desenvolvidas com alvos em receptores, enzimas, nucleotídeos e nucleosídeos deste sistema, buscando uma melhor compreensão do mecanismo desta condição e na busca constante de amenizar os efeitos lesivos da sepse.

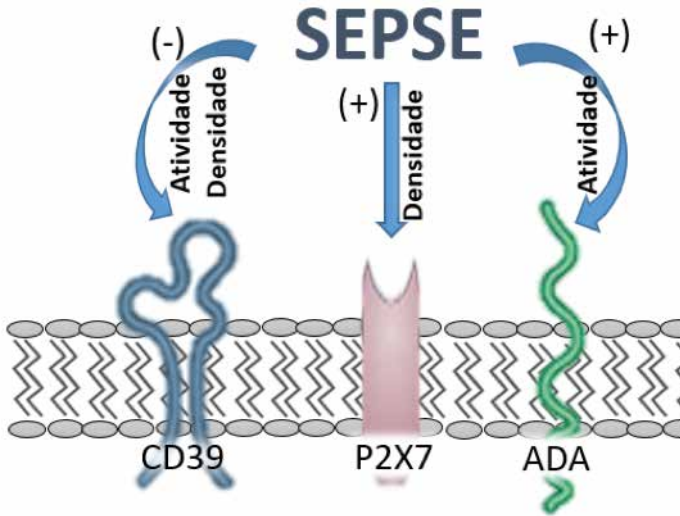
Em trabalho recente, Savio *et al.* (2019) verificaram que a maior ativação do receptor P2X7 (P2X7R) em macrófagos pode contribuir para a produção de Óxido Nítrico (ON), citocinas inflamatórias e exacerbar a resposta inflamatória na sepse. Sendo assim, a inibição desse receptor com o uso de BBG (de *antagonista brilliant blue G*), diminui a produção de citocinas inflamatórias (IL1-β, IL-6 e IL-10), a produção de ON e o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal 3 horas após a indução da sepse. Dessa maneira, esses dados reforçam a ideia de que o ATP, atuando através do P2X7R em macrófagos, contribui para a resposta inflamatória nas fases iniciais da sepse (Savio *et al.*, 2017). Essa mesma constatação foi vista por Wu *et al.* (2017), quando camundongos tratados com antagonista do P2X7R (A740003) tiveram uma regressão da sepse, reduziram as respostas inflamatórias e atenuaram a disfunção da barreira intestinal com base na evidência de que os camundongos tratados exibiram uma síntese de citocinas pró-inflamatórias atenuadas e taxas de apoptose epitelial menores do que os não tratados. Assim, os autores sugerem que o bloqueio do P2X7R pode ser um potencial alvo terapêutico no tratamento da disfunção da barreira intestinal induzida pela sepse (Wu *et al.,* 2017).

Outro receptor que está envolvido na condição da sepse é o P2X4 (P2X4R). Em estudo envolvendo camundongos nocaute para este receptor, Csóka *et al.* (2018), além de confirmarem que os níveis de ATP extracelular aumentam durante a sepse, verificaram que esta molécula pode atuar sobre o P2X4R, eliminando bactérias e protegendo contra lesão de órgãos e morte, uma vez que estes camundongos apresentaram carga bacteriana aumentada e diminuição da sobrevida em comparação com os controles. O estudo também utilizou Invermectina (ativador alostérico do P2X4R) como abordagem farmacológica para estudar o papel do P2X4R na sepse. Verificou-se que a Invermectina aumentou a morte bacteriana em macrófagos e melhorou o controle bacteriano e a

sobrevivência dos animais após a sepse. Uma das suposições é de que o P2X4R aumenta a liberação de mediadores inflamatórios, como a prostaglandina E2, responsável pela dor e inflamação (Csóka *et al.*, 2018).

A sepse aguda ainda foi investigada em camundongos deficientes dos receptores P2X1, P2X4 e P2X7. Verificou-se que os animais sem o P2X4R e o P2X7R estavam significativamente mais suscetíveis à sepse, morrendo mais rapidamente e tendo níveis plasmáticos de citocinas (IL-1β) maiores. Dessa maneira, os autores confirmaram que a ativação do P2X7R e do P2X4R protege contra infecções graves, seja limitando o número de bactérias no sangue ou diminuindo a secreção dessas citocinas (Greve *et al.*, 2017).

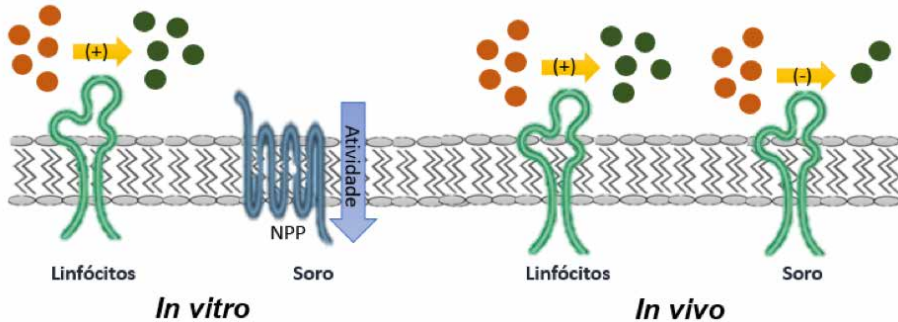
Em nosso grupo de pesquisa, o sistema purinérgico foi investigado na sepse em nível de atividade e densidade enzimática, conforme Figura 2. Em linfócitos, a atividade da CD39 encontrou-se diminuída 24h após a indução da sepse, e a atividade da ADA estava aumentada. Os níveis de ATP foram analisados em soro e se mostraram aumentados neste mesmo período, contribuindo com os resultados obtidos na atividade. A densidade da CD39 realizada em tecido também confirmou esses resultados se mostrando diminuída, enquanto o P2X7R se encontrou elevado (Miron *et al.,* 2018). Esses resultados confirmam as suposições que vêm surgindo no estudo da sepse e demonstram a ligação do sistema purinérgico neste modelo inflamatório.

Figura 2: Efeitos da sepse sobre componentes do sistema purinérgico

Fonte: autoras (2019).

De acordo com os dados mostrados até agora, pode-se supor que um aumento na atividade da CD39 poderia diminuir os efeitos da sepse, uma vez que ocorreria maior hidrólise de ATP. Foi isso que Csóka e colaboradores (2015) conseguiram verificar em sua pesquisa com esta enzima. Verificaram que os animais em que se injetou apirase antes da indução da sepse apresentaram uma menor mortalidade em relação a animais *knockout* para CD39. Além disso, a enzima foi capaz de diminuir os níveis de citocinas e quimiocinas (TNF-α, IL-6, IL-10, IL-12p40, e MIP-2) e proteger contra inflamação e lesão dos órgãos (coração e rim) (Csóka *et al.*, 2015). Esses dados confirmam a ação protetora da CD39 na sepse.

Em 2007, Vuaden e colaboradores realizaram uma pesquisa *in vitro* e *in vivo* a fim de melhor compreender o envolvimento da hidrólise de nucleotídeos extracelulares em modelo de endotoxemia induzida por LPS. Como mostra a Figura 3, *in vitro*, eles observaram um aumento na hidrólise de nucleotídeos nos linfócitos e uma diminuição na atividade enzimática da NPP no soro sanguíneo. *In vivo* houve aumento da hidrólise de nucleotídeos nos linfócitos

e uma diminuição na hidrólise de todos os nucleotídeos testados no soro sanguíneo. Por fim, sugere-se um aumento do metabolismo de nucleotídeos extracelulares dependentes do tempo de indução da sepse em linfócitos e soro sanguíneo após a utilização do LPS para indução de endotoxemia, mostrando, mais uma vez, a sensibilidade das enzimas nucleotidades em relação ao LPS (Vuaden *et al.*, 2007).

Figura 3: Efeito do LPS em modelo de endotoxemia sobre hidrólise de nucleotídeos em linfócitos e soro de modelos in vitro e in vivo

Fonte: autoras (2019).

A adenosina, por sua vez, tem papel protetor contra a sepse induzida por LPS (Riff *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2019). Riff *et al.* (2017) avaliaram o papel da adenosina na linfopenia de camundongos sépticos e verificaram que a interferência com a sinalização de adenosina pode ser potencialmente benéfico para pacientes sépticos com leucopenia, já que a produção de IL-15, responsável por aumentar a sobrevivência em modelo de sepse, é dependente de adenosina (Riff *et al.*, 2017). Além de comprovar que a adenosina atenua a disfunção cardíaca induzida por LPS por inibir a função mitocondrial, Zeng e colaboradores (2019) confirmaram que a condição da sepse está ligada ao gênero. O prognóstico é melhor para as fêmeas por possuírem mais fatores anti-inflamatórios, como a IL-10, e substâncias com atividade semelhante ao estrogênio reduzindo a ocorrência de imunossupressão. A adenosina tem atividade semelhante ao estrogênio e sua função é mediada por receptores de estrogênio (Zeng *et al.*, 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sepse é caracterizada como uma condição letal em todo o mundo. Neste estudo aqui apresentado, foram mostrados dados epidemiológicos e algumas das características dessa condição. Por mais avançadas que sejam as pesquisas, ainda há certa carência na prevenção e no tratamento da sepse, de modo que ainda se desenvolvem buscas para melhor compreensão dos efeitos dessa disfunção.

Nesta busca, um dos sistemas que tem íntima ligação com a sepse é o sistema purinérgico. Verificou-se que a enzima CD39, os receptores P2X7 e P2X4, além do ATP e da adenosina, sofrem alteração desde o início até o final da condição e possuem, em todos os seus níveis, indícios de ser alvo promissor na busca de uma melhor compreensão da sepse, para encontrar-se um tratamento mais eficiente. Porém, algumas contradições ainda são encontradas em relação a essa ligação, como apresentado anteriormente, necessitando, assim, de novas pesquisas, talvez, com outras estratégias para estabelecer um conceito aceitável e utilizável nas redes de saúde.

REFERÊNCIAS

CINAR I; SIRIN B; AYDIN P. *et al.* Ameliorative Effect of Gossypin Against Acute Lung Injury in Experimental Sepsis Modelo f Rats. Life Science. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.02.039. 2019.

CSÓKA B; NÉMETH Z. H.; TORO G. *et al.* CD39 improves survival in microbial sepsis by attenuating systemic inflammation. FASEB Journal. 29 (1): 25-36. DOI: 10.1096/fj.14-253567. 2015.

CSÓKA B; NÉMETH Z. H.; SZABÓ I. *et al.* Macrophage P2X4 receptors augment bacterial killing and protect against sepsis. JCI insight. 3(11):99431. DOI: 10.1172/jci.insight.99431. 2018.

FERRERO-MILIANI L; NIELSEN O. H.; ANDERSEN O. S.; GIRARDIN S. E. Chronic Inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in Interleukin-1B Generation. Clinical and Experimental Immunology, v. 147, p. 227-235, 2006.

GREVE A. S.; SKALS M; FAGERBERG SK. *et al.* P2X1, P2X4, and P2X7 Receptor Knock Out Mice Expose Differential Outcome of Sepsis Induced by α-Haemolysin Producing Escherichia coli. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 7: 113. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00113, 2017.

HEITRICH M; GARCIA D. M. A.; STOYANOFF T. R.; RODRIGUEZ J. P.; TODARO J. S.; AGUIRRE M. V. Erythropoietin attenuates renal and pulmonary injury in polymicrobial induced-sepsis through EPO-R, VEGF and VEGF-R2 modulation. Biomedicine e Pharmacotherapy, v. 8, p. 606-613, 2016.

Instituto Latino Americano Da Sepse, ILAS. Available at: http://www.ilas.org.br/index-modal.php#close. Acesso em: 20 jan. 2019.

LIN E.; CALVANO S. E.; LOWRY S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. Surgery, v. 127, n. 2, p. 117-126, 2000.

MIRON V. V.; BOTTARI N. B.; ASSMANN CE. *et al.* Physical exercise prevents alterations in purinergic system and oxidative status in lipopolysaccharide-induced sepsis in rats. Journal of Cell Biochemistry. 2018. DOI: 10.1002/jcb.27590.

PEPPLER W. T.; ANDERSON Z. G.; SUTTON C. D.; RECTOR R. S.; WRIGHT D. C. Voluntary wheel running attenuates lipopolysaccharide induced liver inflammation in 1 mice. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 310, p. 94-942, 2016.

RIFF R; COHEN Y; EINI-RIDER H. *et al.* Systemic Inflammatory Response Syndrome-Related Lymphopenia is Associated With Adenosina A1 Receptor Dysfunction. Journal of Leukocyte Biology. 102(1): 95-103. DOI: 10.1189/jlb.3A0816-345RR. 2017.

SALLES M. J. C.; SPROVIERI S. R. S.; BEDRIKOW R; PEREIRA A. C.; CARDENUTO S. L.; AZEVEDO P. R. C.; SILVA T. M.; GOLIN V. Síndrome Da Resposta Inflamatória Sistêmica/ Sepse – Revisão e Estudo da Terminologia e Fisiopatologia. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 45, p. 86-92, 1999.

SAVIO L. E. B.; MELLO P. A; FIGLIUOLO V. R. *et al.* CD39 Limits P2X7 Receptor Inflammatory Signaling and Attenuates Sepsis-Induced Liver Injury. Journal Hepatology. 67 (4): 716-726. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.05.021. 2017.

SIEMPOS I. I.; LAM H. C.; DING Y; CHOI M. E.; CHOI A. M.; RYTER S. W. Cecal Ligation and puncture-induced sepsis as a model to study autophagy in mice. Journal of Visualized Experiments. 9 (84):e51066. DOI: 10.3791/51066, 2014.

SINGER M.; DEUTSCHMAN C. S.; SEYMOUR C. W. *et al.* The Third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). JAMA, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

VUADEN, F. C.; COGNATO, G. P.; BONORINO, C.; BOGO, M. R.; SARKIS, J. J. F.; BONAN, C. D. Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and sérum of rats. Life Science, v. 80, p. 1784-1791, 2007.

WATER M.; WNOROWSKA U; WOLLNY T. *et al.* Hypogelsolinemia in Patientes Diagnosed whit Acute Myeloid Leukemia at Initial Stage of Sepsis. Medical Science Monitor. DOI: 10.12659/MSM.911904. 2019.

WU X.; REN J.; CHEN G. *et al.* Systemic Blockade of P2X7 Receptor Protects Agaist Sepsis-Induced Intestinal Barrier Disruption. Scientific Reports. 7 (1): 4364. DOI: 10.1038/s41598-017-04231-5. 2017.

ZENG M.; ZHANG B.; LI B. *et al.* Adenosine Attenuates LPS-Induced Cardiac Dysfunction by Inhibition of Mitochondrial Function via the ER Pathway. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. DOI: 10.1155/2019/1832025. 2019.

DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE E AO SISTEMA PURINÉRGICO

Beatriz da Silva Rosa Bonadiman
Margarete Dulce Bagatini

INTRODUÇÃO

O envelhecimento humano está associado a uma série de alterações metabólicas que predispõem ao desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas. Entre as doenças que acometem os idosos, destacam-se as que comprometem a visão. A mais severa delas é a Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), que leva à perda visual severa e não possui uma forma de tratamento eficaz disponível no mercado. A DMRI, assim como outras morbidades crônicas, está associada a alterações no metabolismo celular, com destaque ao estresse oxidativo e inflamação. Soma-se a isso a sinalização purinérgica, ainda pouco estudada nessa doença, e que está diretamente associada ao processo oxidativo e inflamatório. Assim, este capítulo tem como objetivo esclarecer a relação entre o sistema purinérgico e os principais processos associados ao desenvolvimento da DMRI.

O envelhecimento biológico está associado a uma série de alterações metabólicas nos órgãos e sistemas que aumentam as condições para o aparecimento de disfunções e morbidades crônicas não transmissíveis, doenças crônico-degenerativas e doenças neurodegenerativas (Datta *et al.*, 2017; Arnau; Wascher; Küper, 2019). Dentre as doenças crônicas que mais afetam os idosos, destaca-se a Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), que

é a causa mais comum de perda visual irreversível nessa população em países em desenvolvimento, como o Brasil (Bahadorani; Singer, 2017).

A perda da capacidade visual é um ponto determinante na qualidade de vida do idoso, interferindo em suas atividades práticas diárias, em sua saúde mental, podendo constituir um significativo fator de risco para comorbidades, como as decorrentes de quedas (Bellini; Freitas, 2008; Bonadiman *et al.*, 2017). A perda visual no envelhecimento ocorre devido a uma redução da capacidade do epitélio pigmentar da retina (EPR) e da membrana de Bruch (MB) em realizarem a "reciclagem" dos fotorreceptores e a fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores. Devido a isso acontece um acúmulo de agregados proteicos e lipídicos no interior do EPR e uma maior oxidação da células, gerando moléculas instáveis, os radicais livres (RL) e as espécies reativas ao oxigênio (EROs), favorecendo o desenvolvimento da doença (Bellini; Freitas, 2008; Jager; Mieler; Miller, 2008; Bonadiman *et al.*, 2017).

No entanto, em um estado fisiológico saudável, esses tecidos possuem enzimas antioxidantes endógenas capazes de neutralizar as EROs e os RL, gerados como consequência fisiológica do metabolismo. No decurso da injúria tecidual, ocorre a superprodução desses agentes oxidantes, não permitindo que o sistema antioxidante endógeno consiga neutralizar os efeitos dessas moléculas, desencadeando, portanto, uma condição patológica (Bellini; Freitas, 2008; Bonadiman *et al.*, 2017).

Além disso, as moléculas reativas levam a um aumento de agentes inflamatórios no microambiente tecidual. O principal objetivo dessa resposta inflamatória é a reparação das células/tecidos danificados. No entanto, ela também contribuiu para um maior agravamento da DMRI (Datta *et al.*, 2017). Segundo Natoli *et al.* (2017), nessa etapa, ocorre um acúmulo de macrófagos na retina e no espaço sub-retiniano, bem como a expressão aumentada de citocinas inflamatórias.

Juntamente com o processo inflamatório, o sistema purinérgico atua através das suas biomoléculas, como os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e seu derivado nucleosídico adenosina (ADO). Ambos – ATP extracelular e ADO – são controlados por ecto-enzimas, em especial pela ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) e a adenosina desaminase (ADA), ancoradas extracelularmente (Corso *et al.*, 2016).

De acordo com Corso e colaboradores (2016), na retina, os nucleotídeos de adenina estão envolvidos não apenas na sinalização entre os diferentes tipos de células, mas os níveis elevados de ATP extracelular colaboram para a neurodegeneração retiniana.

Franklin e Johnson (1992), em um estudo *in vitro*, sugerem que os purinoreceptores contribuem para regular o processo inflamatório e as respostas degenerativas, estimulando a síntese e liberação de várias citocinas e quimiocinas. Além desses estudos citados, trabalhos já demonstraram que os purinoreceptores (P2X e P2Y) são expressos em vários tipos de células da retina, tais como fotorreceptores, células ganglionares da retina, células bipolares e células de Muller (Wheeler-Schilling *et al.*, 2001; Corso *et al.*, 2016).

Aspectos anatômicos do olho humano

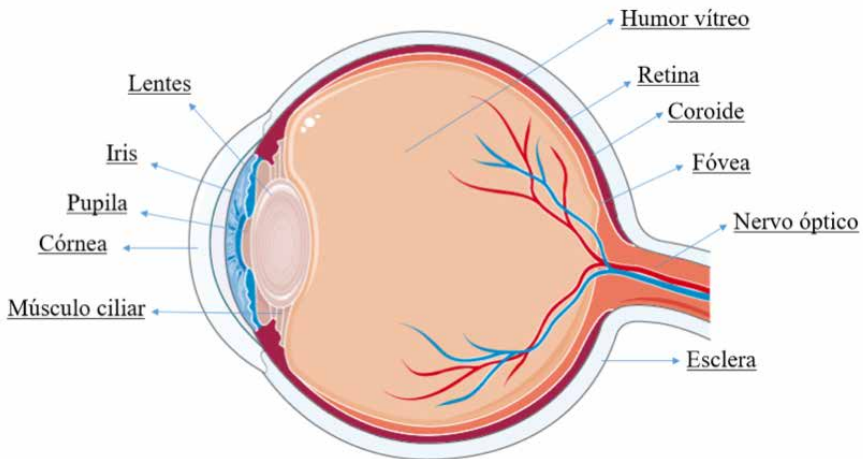
O globo ocular possui forma esférica, sendo constituído pela córnea, pelo cristalino, humor aquoso e humor vítreo. Sua porção interna é organizada em três camadas semelhantes: a retina, a coroide e a esclera (Parier; Soubrane, 2008; Helene; Helene, 2011).

A retina constitui-se por fotorreceptores (cones e bastonetes), responsáveis pelo processamento da informação visual. Ligado aos fotorreceptores, encontra-se o EPR, que consiste em uma única camada de células responsáveis pela manutenção e pelo funcionamento dos fotorreceptores. O EPR é unido à MB (membrana permeável situada entre o EPR e a coroide) (Strauss, 2005; Jager; Mieler; Miller, 2008; Brito, 2008).

A coroide, uma camada espessa e com muitos vasos sanguíneos, localiza-se imediatamente a seguir da MB e tem como função fornecer oxigênio e nutrientes ao EPR e aos fotorreceptores (Parier; Soubrane, 2008; Helene; Helene, 2011).

O EPR desempenha um papel fundamental na manutenção da função visual. Ele participa na "reciclagem" dos fotorreceptores e na fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores, permitindo a sua constante renovação (Strauss, 2005; Rattner; Nathans, 2006). Sua alta capacidade fagocítica ocorre durante toda a vida. Como consequência, tem-se a acumulação de agregados proteicos e lipídicos (lipofuscina) no interior das células do EPR durante o envelhecimento. A lipofuscina funciona como fotossensibilizador, gerando EROs

(Sparrow; Boulton, 2005; Brito, 2008; Bellini; Freitas, 2008) e contribuindo para a disfunção do EPR, conforme demonstrado na Figura 1.

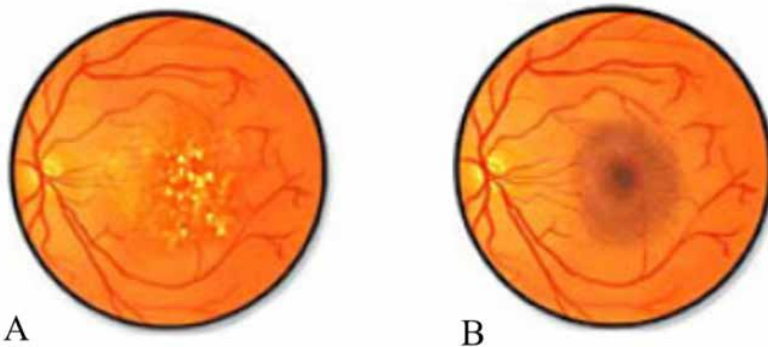
Figura 1: Anatomia do olho humano

Fonte: autoras (2019).

Dessa forma, a coróide, a MB e o EPR formam em conjunto a barreira hematorretiniana, que regula as trocas metabólicas locais (Queiroz *et al.*, 2010).

Sendo assim, com o decorrer do envelhecimento humano, algumas alterações morfológicas importantes ocorrem no olho. Geralmente, por volta dos 40-50 anos de idade, o primeiro sintoma oftalmológico que surge é a diminuição da capacidade de acomodação ou de focalização de objetos próximos (presbiopia). Com o passar dos anos, também ocorre a diminuição do campo visual periférico, da sensibilidade ao contraste, da discriminação das cores, da capacidade de recuperação após exposição à luz, da adaptação ao escuro e da noção de profundidade (Pescosolido *et al.*, 2016).

Degeneração macular relacionada à idade (DMRI)

A DMRI foi descrita pela primeira vez, em 1903, por Oeller. Em 1926, Junius e Kunt apontaram-na como a principal causa de cegueira em pessoas com mais de 55 anos de idade (Ávila, 2003). Essa doença se manifesta de duas formas: seca – sem neovascularização – e exsudativa – neovascular –, associada à formação de cicatriz fibrovascular e ao processo sero-hemorrágico da retina (Miller, 1990; Ávila, 2003; Yonekawa; Miller; Kim, 2015). Na Figura 2, observa-se uma imagem da retina com drusas (A) e uma retina com formação de neovasos e exsudato sanguíneo.

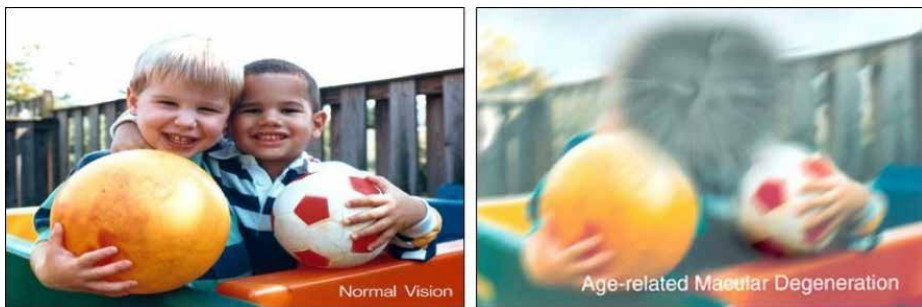
Figura 2: Degeneração macular relacionada à idade seca e exsudativa

Fonte: National Eye Institute (2017) – adaptada.

* A: DMRI seca. B: DMRI exsudativa

As reações fotoquímicas originadas na retina e no EPR tornam estas estruturas extremamente suscetíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo. O processo de oxidação gera os radicais livres, que são altamente reativos com os tecidos oculares subjacentes. Dessa forma, sugere-se que esses processos de oxi-redução estão associados diretamente na gênese da DMRI (Bellini; Freitas, 2008).

O dano na visão causado pela degeneração ocorre em decorrência da disfunção dos fotorreceptores, podendo estar associado com as formas seca ou exsudativa da doença. Na primeira, ocorre atrofia da rede coriocapilar e do EPR a ela associado. Na segunda, os neovasos da coriocapilar rompem a MB e o EPR, invadindo a retina, onde podem sangrar e exsudar. Já nos estágios tardios da doença, forma-se um tecido fibroso (cicatriz) na região macular, com o consequente decréscimo da visão central (Bellini; Freitas, 2008; Canovas *et al.*, 2009).

Os sintomas, no início da doença, ocorrem devido ao comprometimento macular. O paciente relata: diminuição da sensibilidade ao contraste; impressão de falta de luz para ler ou escrever; ocorrência de embaçamento ou amarelamento das imagens; diminuição da acuidade visual, percepção de linhas retas como deformadas ou onduladas e mancha sombreada central (Bellini; Freitas, 2008), conforme apresentado na Figura 3.

Figura 03: Visão do paciente saudável e paciente com DMRI

Fonte: National Eye Institute (2017) – adaptada.

Embora a etiologia da doença ainda não esteja totalmente elucidada, estudos têm demostrado que o acúmulo de estresse oxidativo e o processo de inflamação são os principais agentes associados à degeneração da retina e à evolução da DMRI (Bellini; Freitas, 2008).

Em um indivíduo saudável, o metabolismo do EPR produz estresse foto-oxidativo e fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores. No entanto, com o passar dos anos, esses fatores acumulam-se no EPR, causando danos às células; somam-se a isso os fatores externos que podem agravar essa injúria

tecidual e contribuir para a aceleração e estabelecimento da doença. Esse é o caso da radiação ionizante, luz ultravioleta, metais pesados, agentes químicos e maus hábitos alimentares (Datta *et al.*, 2017).

Devido a isso, o sistema imunológico se envolve para tentar proteger o EPR dos danos oxidativos e estabelecer a homeostasia. Nesse processo, células imunológicas como macrófagos e linfócitos complementam o sistema, contribuindo para a remoção de produtos tóxicos (Ermakova, 2018).

Nesse sentido, em 2008, o pesquisador Medzhidov propôs chamar o fenômeno de para-inflamação, uma resposta adaptativa do sistema imunológico, que tem como papel fisiológico manter a homeostase (ou reajustar o limiar homeostático do tecido) e restaurar a funcionalidade tecidual. Com o envelhecimento, essa proteção pode falhar, especialmente se houver uma predisposição genética ou fatores ambientais agravantes, e assim potencializar a perda visual, piorando a gradativamente a qualidade de vida do paciente (Medzhidov, 2008; Ermakova, 2018).

Sistema purinérgico e DMRI

A sinalização purinérgica tem relevante ação no processo inflamatório e oxidativo, já que os purinoreceptores e os nucleotídeos estão diretamente relacionados à sinalização de injúria tecidual (Corso *et al.*, 2016).

Sendo assim, uma investigação realizada em 2019 sugere que, na retina, as purinas estão envolvidas não apenas na sinalização entre os diferentes tipos de células (Housley; Bringmann; Reichenbach, 2009), mas os altos níveis de ATP extracelular também estimulam a neurodegeneração da retina (Shen *et al.*, 2005; Fletcher, 2010; Corso *et al.*, 2016).

Outras investigações também demonstraram que o ATP extracelular contribui para a neurotransmissão excitatória rápida, pela ativação dos receptores P2X e P2Y expressos pela maioria das classes de neurônios da retina (Housley, 2009).

Já a adenosina é descrita como um importante inibidor da atividade neuronal na retina e suprime a neurotransmissão excitatória por vários mecanismos, como a inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem pré-sinápticos, resultando na redução da liberação do transmissor (Housley *et al.*, 2009), favorecendo assim o desenvolvimento da DMRI.

Natomi *et al.* (2013) estudaram em modelos *in vivo* e *in vitro* de DMRI exudativa e confirmaram que pacientes com DMRI apresentam um aumento significativo de ATP extracelular e apresentam um processo de neurodegeneração da retina mais relevante. Além disso, eles sugerem que esse aumento do ATP extracelular poderia ser um potencial neurotóxico facilitando a apoptose de células fotorreceptoras via ativação de P2X7.

Gu *et al.* (2013) realizaram um estudo de associação genética de polimorfismos funcionais nos genes P2RX7 e P2RX4 em uma coorte de 744 pacientes com DMRI e 557 controles caucasianos pareados por idade. A variante P2X4 Tyr315Cys foi duas vezes mais frequente em pacientes com DMRI em comparação aos controles, prevendo a suscetibilidade à doença. A imuno-histoquímica indicou que os receptores P2X7 e P2X4 estavam coexpressos na microglia e nos macrófagos, mas nenhum dos receptores era visto nas células do EPR. Tais resultados demonstram que um haplótipo, incluindo duas variantes raras em P2RX7 e P2RX4, confere uma interação funcional entre estes dois receptores variantes, o que prejudica a função normal de eliminação de macrófagos na microglia. A falha desta via fagocítica mediada por P2X7 pode prejudicar a remoção de depósitos sub-retinianos e predispor à DMRI.

Nesse sentido, Corso *et al.* (2016) investigaram em diferentes tipos celulares a interação entre o açafrão e os receptores P2X7. Eles verificaram que o açafrão protege os fotorreceptores dos danos induzidos pela luz, preservando a morfologia retiniana. Além disso, eles descobriram que o açafrão influencia positivamente a viabilidade de células retinianas primárias de ratos e células 661W derivadas de fotorreceptores expostas ao ATP e reduziu o aumento de cálcio intracelular induzido por ATP em células 661W. Os resultados apontam que a sinalização de cálcio mediada por P2X7 pode ser um alvo terapêutico crucial no tratamento de doenças neurodegenerativas como a DMRI.

A literatura também apresenta que a ativação do inflamasoma NLRP3 no sistema inflamatório pode induzir a morte das células do EPR e parece ativar o receptor P2Y7, favorecendo o desenvolvimento da doença (Martin *et al.*, 2012; Chen; Xu *et al.*, 2015).

Estudos *in vitro* mostraram que o inflamassoma NLRP3 em células RPE pode ser ativado por vários estímulos extracelulares que podem existir no olho durante o processo de envelhecimento, como AluRNA (Tarallo *et al.*, 2012; Chen; Xu, 2015), amilóide-β (Liu *et al.*, 2013), lipofuscina (Brandstetter *et al.*,

2015) ou lipoproteínas oxidadas (Kauppinen *et al.*, 2012). Dependendo dos estímulos, a ativação do inflamassoma NLRP3 em células RPE pode resultar na produção de IL-18 (Tarallo *et al.*, 2012) ou IL-1β (Anderson *et al.*, 2012) ou ambas (Liu *et al.*, 2013; Brandstetter *et al.*, 2015).

A ativação descontrolada do NLRP3 pode, ainda, estar associada à autofagia (maquinaria de autolimpeza de uma célula) – um desequilíbrio no sistema de autofagia pode levar ao acúmulo intracelular de moléculas tóxicas e na geração de mais EROs – o que pode desencadear a ativação progressiva do inflamassoma (Levine *et al.*, 2011; Chen; Xu *et al.*, 2015) e favorecer ainda mais o processo da doença.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos da última década revelaram algumas ligações causais entre a inflamação, o estresse oxidativo e o sistema purinérgico no desenvolvimento da DMRI. À medida que envelhecemos, danos oxidativos se acumulam, persistem e aumentam de acordo com o envelhecimento.

O estresse oxidativo parece ter uma ligação direta com o acúmulo de substâncias altamente reativas no EPR, causando a disfunção do tecido. Junto a esse processo, a inflamação é ativada com o objetivo de restaurar o tecido. No entanto, devido ao envelhecimento, esse sistema não consegue atacar de forma efetiva os danos causados pelo estresse, fazendo com que acumule no tecido células do sistema imune. Além do mais, a resposta inflamatória pode se tornar desregulada devido à predisposição genética, à modificação epigenética ou à intervenção ambiental, contribuindo para a doença macular.

O sistema purinérgico parece estar diretamente ligado ao desenvolvimento da DMRI, pois nessa doença ocorre um aumento do acúmulo de ATP e uma maior ativação os receptores desse sistema. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para elucidar a real associação entre o estresse oxidativo, a inflamação e o sistema purinérgico no processo de desenvolvimento da DMRI, a fim de que pesquisas futuras possam revelar novos mecanismos acerca da patogênese da DMRI.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, O. A.; FINKELSTEIN, A.; SHIMA, D. T. A2E induces IL-1ss production in retinal pigment epithelial cells via the NLRP3 inflammasome. PLoS One, v.8, n.67263, 2013.

ARNAU, S.; WASCHER, E.; KUPER, K. Age-related differences in reallocating cognitive resources when dealing with interruptions. NeuroImage,v. 10, n. 1016, 2019.

ÁVILA, M. A retina século XXI. Arq. Bras. Oftalmol., v. 66, n. 5, p. 719-730, 2003.

BAHADORANI, S.; SINGER, M. Recent advances in the management and understanding of macular degeneration. F1000Research, v. 6, n. 516, p. 1-7, 2017.

BELLINI, L. P.; FREITAS, A. M. Atualização no diagnóstico e tratamento da degeneração macular relacionada à idade. Revista da AMRIGS, v. 52, n. 3, p. 204-208, 2008.

BONADIMAN B. S. R. *et al.* Guarana (Paullinia cupana): Cytoprotective effects on age-related eye dysfunction. Journal of Functional Foods. v. 36, n. 2017, p. 375-386, 2017.

BRANDSTETTER, C, *et al.* Light induces NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells via lipofuscin-mediated photooxidative damage. J. Mol. Med, v. 1, 2015.

BRITO, A. F. M. Regulação da produção de Interleucina8 por oxiesteróis no Epitélio Pigmentado da Retina: Implicações para a Degenerescência Macular Relacionada com a Idade. Faculdade de Ciência e Tecnologia Universidade de Coimbra. Dissertação de mestrado em engenharia biomédica. 2008.

CANOVAS, R. *et al.* Macular pigments. Arq. Bras. Oftalmol., v. 72, n. 6, p. 839-844, 2009.

CHEN, M; XU, H. Parainflammation, chronic inflammation and age-related macular degeneration. J Leukoc Biol. v. 98, n. 5, p.713–725, 2015.

CORSO, L. *et al.* Saffron reduces ATP-induced retinal cytotoxicity by targeting P2X7 receptors. Purinergic Signalling. v. 12, n. 1, p. 161-174, 2016.

DATTA, S. *et al.* The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in nonneovascular AMD. Progress in Retin and Eye Research, v. 20, n. 1, 2017.

ERMAKOVA, N. A. The role of inflammation in Age-related Macular Degeneration. Vestn Oftalmol. v. 134, n. 6, p. 116-123, 2018.

FLETCHER, E. L. Mechanisms of photoreceptor dath during retinal degeneration. Optom Vis Sci. v. 87, n. 1, p. 430-440, 2010.

FRANKLIN J. L. JOHNSON J. M. JR. Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. Trens in neuroscience. v. 15, n. 12, p. 501-508, 1992.

GU, B. J. *et al.* A rare functional haplotype of the P2RX4 and P2RX7 genes leads to loss of innate phagocytosis and confers increased risk of age-related

macular degeneration. The FASEB Journal, v. 27, 2013.

HELENE, A. HELENE, A. F. Some aspects of the optics of the human eye. Revista Brasileira de Ensino de Física., v. 33, n. 3, 3312, 2011.

HOUSLEY, G. D.; BRINGMANN, A; REICHENBACH, A. Purinergic signalling in special senses. Trends Neurosci, v. 32, n. 128, 2009.

JAGER, R. D; MIELER, W. F; MILLER, J. W. Age-related macular degeneration. N Engl J Med. v. 358, n. 24, p. 2606-17, 2008.

KAUPPINEN, A. *et al.* Oxidative stress activates NLRP3 inflammasomes in ARPE-19 cells-Implications for age-related macular degeneration (AMD). Immunol. Lett, v. 147, p. 29-33, 2012.

LEVINE, B; MIZUSHIMA, N; VIRGIN, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. Nature. v. 469, p. 323-335, 2011.

LIU, R. T. *et al.* Inflammatory mediators induced by amyloid-beta in the retina and RPE in vivo: implications for inflammasome activation in age-related macular degeneration. Invest. Ophthalmol.Vis.Sci. v. 54, p. 2225-2237, 2013.

MARTIN, D. F. *et al.*, Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. Ophthalmology. v.119, p. 1388-1398, 2012.

MEDZHITOV R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. v.454, p. 428-435, 2008.

MILLER, J. W. Age-related macular degeneration revisited – Piecing the puzzle: The nical trial. Arch. Ophthalmol., v. 108, n. 6, p. 816-824, 1990. National Eye Institute (NEI). Photos age-macular degeneration. Disponível em: https://www.flickr.com/photos/nationaleyeinstitute/7544733860/. Acesso em: Julho de 2017.

NATOLI, R. *et al.* Microglia-derived IL-1β promotes chemokine expression. By Muller cells and RPE in focal retinal degeneration. Molecular Neurodegeneration, v. 12, n. 31, p. 1-11, 2017.

NATOMI, S. *et al.* Dynamic Increase in Extracellular ATP Accelerates Photoreceptor Cell Apoptosis via Ligation of P2RX7 in Subretinal Hemorrhage. Plos one. v.8, n.1, 2013.

PARIER, V; SOUBRANE, G. Age-related macular degeneration. Rev. Med. Interne. v. 29, n. 3, p. 215-23, 2008.

PESCOSOLIDO, N. *et al.* Age-related changes in the kinetics of human lenses: prevention of cataract. Int J Ophthalmol. 10, 1506-1517, 2016.

QUEIROZ, J. M. *et al.* Age-related macular degeneration: histopathological considerations. Rev. Bras. Oftalmol., v, 6, n. 1, p. 400-406, 2010.

RATTNER, A; NATHANS, J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. Nat Rev Neurosci. v.7, n. 11, p. 860-72, 2006.

SHEN, L. *et al.* Oxidative damage is a potencial cause of cone cells death in retinits oigmentosa. J Cell Physiol. v. 203, n. 1, p. 457-464, 2005.

SPARROW, J. R; BOULTON, M. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. Exp Eye Res. v. 80, n.5, p. 595-606, 2005.

STRAUSS, O. The retinal pigment epithelium in visual function. Physiol Rev. v. 85, n. 3 p. 845-81, 2005.

TARALLO, V. *et al.* DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. Cell. V.149, p. 847-859, 2012.

WHEELER-SCHILLING, T. H. *et al.* Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells. Mol Brain Res. v. 92, n.1, p. 177-180, 2001.

YONEKAWA, Y.; MILLER, J. W.; KIM, I. K. Age-Related Macular Degeneration: Advances in Management and Diagnosis. J. Clin. Med., v. 4, n. 2, p. 343-59, 2015.

DOENÇA DE ALZHEIMER

Fernanda Cardoso Teixeira
Roselia Maria Spanevello

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é considerada a causa mais comum de demência. É uma patologia neurodegenerativa crônica caracterizada pela presença de placas senis extracelulares compostas de agregados da proteína beta amiloide (Aβ), emaranhados neurofibrilares, neuroinflamação e morte neuronal em regiões cerebrais envolvidas com aprendizagem e memória.

Considerando que a sinalização purinérgica pode modular processos relacionados à patogênese e à progressão da DA, este capítulo tem como foco demonstrar os principais achados relacionados as alterações nas enzimas purinérgicas (NTPDase, 5´-nucleotidase e adenosina desaminase), bem como em receptores para nucleotídeos (P2X e P2Y) e adenosina (A1, A2A, A2B, A3) em estudos pré-clínicos e clínicos relacionados com a DA.

A partir dos dados descritos na literatura, entende-se que a modulação terapêutica de componentes envolvidos com a sinalização purinérgica pode ser uma estratégia promissora capaz de influenciar na progressão desta doença neurodegenerativa.

Doença de Alzheimer (DA)

Memória refere-se ao processo de aquisição, formação, conservação e evocação de informações (Izquierdo *et al.*, 1999; 2006). A memória pode ser classificada de acordo com a função, o conteúdo e tempo de duração. Dessa forma, tem-se a memória de trabalho, as memórias declarativas e procedurais e, por fim, a memória de curta e longa duração, respectivamente (Izquierdo; Mcgaugh, 2000; Júnior; Faria, 2015).

A DA é uma patologia neurodegenerativa caracterizada por um declínio progressivo na função cognitiva, que afeta principalmente a memória de curto prazo (Chen, 2018). Essa doença é considerada a principal causa de demência entre a população no mundo, sendo que sua prevalência aumenta significativamente em indivíduos após os 65 anos de idade (Mayeux; Stern, 2012).

Essa patologia vem sendo considerada uma pandemia em decorrência do crescimento acelerado no número de casos – aumento de 244% entre 1990 e 2010 (Grill *et al.*, 2015). Estima-se que, em 2030, 67,5 milhões de pessoas no mundo apresentarão DA, sendo que este número poderá atingir 115,4 milhões até 2050 (Nowrangi *et al.*, 2015). Esses dados são impactantes, e refletem a repercussão desta doença para a saúde pública, em função do grande número de acometidos e ainda em relação aos prejuízos acarretados no cotidiano do indivíduo portador e nas suas relações interpessoais (Qui *et al.*, 2009).

A DA é clinicamente classificada em dois tipos de acordo com o seu tempo de início: a do tipo familiar e a do tipo esporádica. Ambas as formas possuem as mesmas características patológicas, principalmente relacionadas ao decréscimo das funções cognitivas as quais incluem a memória recente, a linguagem, a capacidade de julgamento e a atenção, dentre outros. A DA do tipo familiar, também chamada de DA de início precoce pela sua ocorrência antes dos 60 anos, caracteriza-se por um declínio rápido das funções cognitivas (Mayeux; Stern, 2012). Esse tipo representa 1 a 5% dos casos de DA e apresenta um padrão de transmissão autossômica dominante que envolve mutações nos genes da proteína precursora amilóide e das presenilinas 1 e 2 (Mayeux; Stern, 2012; Grimm *et al.*, 2016). A DA do tipo esporádica ou de início tardio é mais frequente em indivíduos após os 60 anos, compreendendo mais de 95% dos casos de DA. Esse tipo de DA apresenta componentes genéticos e não genéticos, como idade avançada, sexo feminino, estilo de vida e comorbidades (doença

cerebrovascular, traumatismo craniano, diabetes tipo II, obesidade) (Mcdowell, 2001; Bekris *et al.*, 2010; Mayeux; Stern, 2012; Reitz; Mayeux, 2014; Grimm *et al.*, 2016; Scheltens *et al.*, 2016).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e na progressão da DA ainda não foram totalmente esclarecidos, o que demonstra a complexidade do seu estudo. A DA é uma patologia neurodegenerativa resultante de falha sináptica e morte celular em áreas específicas do cérebro, as quais são essenciais para o processamento da memória (Scheltens *et al.*, 2016).

Há décadas, a teoria dominante para a sua patogênese é a hipótese da cascata amilóide (Selkoe; Hardy, 2016). De acordo com essa teoria, a deposição extracelular de placas formadas pelo peptídeo beta amilóide (Aβ) e o acúmulo intracelular de emaranhados neurofibrilares compostos pela proteína tau hiperfosforilada são responsáveis pela perda de sinapses e morte neuronal (Raskin *et al.*, 2015). Entretanto, outros mecanismos também têm sido associados à patogênese da DA, como estresse oxidativo, neuroinflamação, resistência à insulina no cérebro e alterações no sistema colinérgico (Agostinho *et al.*, 2010; Correia *et al.*, 2013; De la Monte; Tong, 2014; Grimm *et al.*, 2016; Cervellati *et al.*, 2016). Nos últimos anos, o papel da sinalização purinérgica também tem sido avaliado nesta condição patológica. Considerando a relevância das alterações encontradas nos componentes do sistema purinérgico associado à DA, a modulação dos receptores e das enzimas que compõem este sistema tem sido apontada como uma via promissora para a pesquisa de novas alternativas terapêuticas para essa doença neurodegenerativa.

Ectoenzimas e a Doença de Alzheimer

Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares de adenina, como ATP, ADP e adenosina, são moléculas que possuem importantes ações no sistema nervoso central (SNC), tais como neurotransmissão, neuromodulação, extensão neurítica, proliferação, diferenciação e morte celular (Rathbone *et al.*, 1999). Além disso, estudos têm demonstrado que o ATP e a adenosina também podem modular processos relacionados à memória (Düster *et al.*, 2014).

A sinalização induzida por esses nucleotídeos e nucleosídeos e sua concentração no meio extracelular são reguladas pela ação de enzimas, como as

ecto-nucleosídeo-trifosfo-difosfoidrolases (E-NTPDases), 5'- nucleotidase e a adenosina desaminase (ADA) (Robson *et al.*, 2006). Essas enzimas constituem uma cascata enzimática altamente organizada que tem início com a ação da NTPDase, a qual hidrolisa ATP e ADP até AMP. O AMP gerado é hidrolisado pela enzima 5´- nucleotidase formando a adenosina, subsequentemente degradada a inosina pela ação da ADA (Robson *et al.*, 2006).

Uma diminuição na atividade das enzimas NTPDase, 5´-nucleotidase e ADA já foi observada em sinaptossomas de córtex cerebral e hipocampo de ratos submetidos a um modelo experimental de demência esporádica do tipo Alzheimer (De Oliveira *et al.*, 2019). Resultados similares também foram observados em um modelo de déficit de memória induzido por escopolamina. A administração intraperitoneal de escopolamina após o treino da esquiva inibitória foi capaz de reduzir a atividade da NTPDase, 5´-nucleotidase e ADA em hipocampo e córtex cerebral de ratos (Marisco *et al.*, 2013). Por outro lado, Gutierres e colaboradores (2012), utilizando este protocolo da escopolamina, demonstraram um aumento na atividade da NTPDase e da ADA e uma diminuição na atividade de enzima 5´-nucleotidase bem como nos níveis de ATP em hipocampo de ratos. Embora o efeito amnésico da escopolamina seja atribuído à diminuição da transmissão colinérgica no SNC, esses achados evidenciam que alterações nas enzimas purinérgicas também podem contribuir para o déficit de memória observado nestes estudos (Gutierres *et al.*, 2012; Marisco *et al.*, 2013).

Considerando o papel do ATP e da adenosina no SNC, uma diminuição na atividade da NTPDase pode favorecer o aumento nos níveis de ATP extracelular, o qual, em altas concentrações, pode contribuir para danos neuronais através da ativação do receptor P2X7 (Bonan, 2012; Volonte *et al.*, 2015; De Oliveira *et al.*, 2019). Além disso, alterações na atividade das enzimas 5´-nucleotidase e ADA podem levar à diminuição dos níveis de adenosina, uma molécula que, além de modular processos de memória, também exerce várias outras ações neuroprotetoras e neuromoduladoras (Bonan, 2012; Stone, 2015; De Oliveira *et al.*, 2019).

Existem poucos estudos avaliando a atividade de enzimas do sistema purinérgico em pacientes com DA. Em estudo *post mortem*, realizado por Alonso-Andrés e colaboradores (2018), primeiramente, demonstrou-se que os níveis de adenosina estão diminuídos em córtex frontal de pacientes com

DA em relação ao grupo controle, já que esses níveis foram mais baixos no estágio inicial quando comparados ao estágio intermediário e avançado da doença. Essa diminuição nos níveis de adenosina foi acompanhada por uma diminuição na atividade das enzimas 5´-nucleotidase citosólica e ADA. Em relação a esse estudo, os dados permitiram concluir que: ocorrem alterações no metabolismo de purinas nos estágios iniciais da doença independente da presença de emaranhados neurofibrilares e placas de peptídeo Aβ; as alterações purinérgicas encontradas são diferentes em relação à região do SNC analisada (córtex frontal, parietal e temporal) e ao estágio da DA; e o metabolismo do nucleosídeo adenosina é um dos mais afetados com alterações significativas nas enzimas relacionadas à sua síntese (5´-nucleotidase) e degradação (ADA) (Alonso-Andrés *et al.*, 2018).

Embora o estudo das enzimas purinérgicas e a relação com a DA ainda sejam limitados, cabe destacar que modulação da atividade dessas enzimas tem sido foco de estudos na busca de estratégias terapêuticas promissoras para patologias neurodegenerativas (Roszeck; Czarnecka, 2015). Entretanto, é importante ressaltar que a presença de vários membros da família das ectoenzimas com alto grau de similaridade entre si torna o desenvolvimento de um inibidor/modulador específico difícil, sendo essa uma limitação a ser superada (Bonan, 2012). Assim, a maioria dos estudos em relação à sinalização purinérgica e a DA tem focado principalmente na busca e/ou efeitos de antagonistas ou agonistas para os receptores purinérgicos (Diaz-Hernandes *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Delekate *et al.*, 2014; Woods *et al.*, 2016).

Purinoreceptores e a DA

Os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina podem mediar suas ações através de receptores purinérgicos localizados na superfície de células (Yegutkin, 2008; Burnstock *et al.*, 2011). Os receptores aos quais os ATP e o ADP podem se ligar, dividem-se em dois grupos: P2X e P2Y. Os receptores de adenosina também são transmembrana acoplados à proteína G e são denominados A1, A2A, A2B e A3 (Robson *et al.*, 2006; Yegutkin, 2008).

O receptor P2X7 é um importante membro da família P2X, uma vez que sua ativação pode levar à abertura de poros na membrana da célula que permite

a passagem de moléculas de até 1 kDa. A ativação desse receptor pode levar à liberação de mediadores inflamatórios, como a interleucina 1β (IL-1β) e o fator de necrose tumoral α (TNF-α), além de estimular a produção de superóxido e óxido nítrico de células microgliais (Parvathenani *et al.*, 2003; Takenouchi *et al.*, 2010). Portanto, o P2X7 tem sido um dos componentes do sistema purinérgico mais investigado dentro do contexto da DA, devido ao fato de desempenhar um papel crucial nos processos de neuroinflamação e neurodegeneração (Parvathenani *et al.*, 2003; Diaz-Hernandez *et al.*, 2011; Illes *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2019).

Em um estudo *post mortem*, McLarnon e colaboradores (2006) demonstraram um aumento da expressão de receptores P2X7 em microglia de portadores de DA. Considerando que o P2X7 é ativado na presença de altas concentrações de ATP, o aumento na expressão desse receptor pode estar associado a mecanismos patológicos característicos da DA como ativação glial e morte celular, os quais são processos que levam a um aumento na concentração extracelular de ATP (McLarnon *et al.*, 2006).

Dados da literatura têm demonstrado também que o P2X7 é capaz de regular a atividade de α-secretases, enzimas envolvidas na formação do peptídeo beta amilóide (Aβ). Diaz-Hernandez e colaboradores (2011) demonstraram que a inibição do receptor P2X7 em um modelo experimental transgênico de DA foi capaz de reduzir a quantidade de placas amilóides no hipocampo, sendo que os mecanismos envolvidos nestes efeitos foram atribuídos a inibição da atividade do glicogênio sintase cinase 3 (GSK3) e aumento da atividade da enzima α-secretase. Em outro modelo experimental de DA, utilizando a injeção hipocampal de peptídeo Aβ, observou-se que o tratamento com um antagonista do P2X7 foi capaz de reduzir a expressão desse receptor, melhorar a integridade da barreira hematoencefálica, aumentar a viabilidade neuronal e diminuir a ativação de células gliais nesta condição experimental (Ryu; Mclarnon, 2008). Esses dados sugerem que a neuroproteção conferida pela modulação farmacológica do P2X7 pode ter um grande potencial terapêutico para controlar a neuroinflamação e morte celular associada a DA.

Outro receptor da classe P2X que tem ganhado destaque dentro do contexto da DA é o receptor P2X4. Uma diminuição nos níveis desse receptor já foi relatada no giro frontal medial e temporal de pacientes com DA (Varma *et al.*, 2009). Além disso, foi demonstrado que em cultura de neurônios de

hipocampo, expostas ao peptídeo Aβ, ocorreu um aumento da expressão do P2X4 antes da morte celular (Varma *et al.*, 2009). O peptídeo Aβ é capaz de induzir uma clivagem mediada pela caspase-3 levando a alterações na expressão, diminuindo o tempo de fechamento do canal, além de afetar a cinética e de impedir a internalização induzida por agonista deste receptor. Assim, esses dados apontam que as alterações no P2X4 são um importante mecanismo associado à disfunção sináptica e morte neuronal induzida pelo peptídeo Aβ (Varma *et al.*, 2009).

Os receptores do tipo P2Y estão amplamente expressos no SNC e são responsáveis por regular a atividade neuronal, a função do sistema neurovascular processos neuroinflamatórios, dentre outros (Idzko *et al.*, 2014). Tem sido demonstrado que o P2Y1 exerce um efeito protetor na DA, pois seu bloqueio foi capaz de reduzir a hiperatividade astrocítica e as alterações de cálcio presentes ao redor das placas beta amilóides (Delekate *et al.*, 2014). Em portadores de DA, a expressão de P2Y2 é significativamente aumentada nos neurônios no início da doença, sendo que essa expressão vai diminuindo conforme o curso clínico da mesma. De acordo com Kong *et al.* (2009), a ativação de P2Y2 nos neurônios causa o aumento da degradação *proteína precursora amiloide* (APP) pelas α-secretases, o que resulta na formação de peptídeos solúveis ao invés de peptídeos β neurotóxicos. Além disso, em um estudo com cultura primária de microglia também foi observado que a ativação do receptor P2Y2 com trifosfato de uridina (UTP) levou a uma maior absorção e degradação do peptídeo Aβ nessas células, ressaltando que esse receptor pode ser um alvo importante para prevenir a acumulação de placas Aβ no SNC e evitar a neurodegeneração associada a esse mecanismo (Erb *et al.*, 2012).

De acordo com a hipótese de neuroinflamação associada a DA, a microglia é atraída pelas placas Aβ e ao serem ativadas podem levar a liberação de mediadores inflamatórios e radicais livres, os quais podem contribuir para a morte neuronal. Em um modelo experimental de DA, com depósito amilóide cerebral, foi observado uma perda significante na capacidade fagocítica da microglia (Whent *et al.*, 2017). Essa disfunção microglial tem sido associada a alterações no receptor P2Y6, uma vez que dados da literatura tem demonstrado que a atividade fagocítica destas células está associada à ativação desse receptor purinérgico (Whent *et al.*, 2017). Além disso, outro estudo também

relatou que o receptor P2Y4 tem um papel importante em aumentar a eficiência de células microgliais na absorção de peptídeo Aβ (Li *et al.*, 2013).

A adenosina ao interagir com os receptores A1, A2A, A2B e A3 exerce várias funções regulatórias no SNC, afetando diretamente processos cognitivos como memória e a aprendizagem (Sebastião; Ribeiro, 2009, Silva *et al.*, 2018). Em relação a DA, os receptores A1 e A2A têm sido os mais estudados, entretanto, as suas implicações na neuroproteção parecem ser diferentes. Enquanto os agonistas dos receptores A1 vêm sendo considerados neuroprotetores, estudos têm relatado que o bloqueio farmacológico ou a interrupção do gene dos receptores da adenosina A2A estão associados à neuroproteção (Rosim *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2018).

Os receptores de adenosina estão acoplados a muitas vias de transdução de sinal. O receptor A1 é acoplado à proteína Gi/o inibitória e está principalmente distribuído no SNC nas regiões do hipocampo, córtex cerebral, cerebelo, medula espinhal, tálamo e no tronco encefálico (Sebastião; Ribeiro, 2009). Esse receptor, quando ativado, é responsável por inibir a adenilil ciclase e reduzir a produção de AMPc, além de ativar a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) bem como quinases reguladoras de sinais extracelulares ERK1, ERK2 e MEK (Boison *et al.*, 2010). Os receptores do tipo A2A e A2B, quando ativados, se acoplam à proteína Gs estimulatória, possuindo como primeiro alvo a adenilil ciclase, com consequente aumento de AMPc e ativação da fosfolipase C (Ralevic *et al.*,1998). Os receptores A2A distribuem-se regularmente no sistema nervoso periférico (SNP) e no SNC, enquanto os A2B podem ser encontrados principalmente no intestino e bexiga, apresentando-se em baixas densidades no SNC (Stone *et al.*, 2009). O receptor A3 está acoplado à proteína Gi/o inibitória ou à proteína Gq ativadora de fosfolipase C. Aparentemente apresenta o mesmo tipo de sinalização que os receptores A_1, inibindo a adenil ciclase e reduzindo a produção de AMPc, no entanto, possui uma baixa expressão em quase todo o encéfalo (Sebastião; Ribeiro, 2009).

Dentre os mecanismos propostos envolvidos na neuroproteção pelo receptor A1, podem destacar-se alterações no influxo de cálcio, o que resulta na inibição da liberação de glutamato e redução de seus efeitos excitatórios (Albasanz *et al.*, 2008). Trabalhos prévios realizados em pacientes com DA demonstraram um aumento na expressão do receptor A1 em hipocampo, sendo que a imunoreatividade desse receptor foi mais acentuada em neurônios com emaranhados

neurofrilibares e neurites distróficas de placas senis do hipocampo (Angulo *et al.*, 2003). Além disso, este mesmo estudo demonstrou que a ativação do receptor A_1 em uma linhagem celular de neuroblastoma humano foi capaz de influenciar a formação de formas solúveis do peptídeo Aβ, o que sugere que este receptor pode ser um potencial alvo terapêutico para a DA (Angulo *et al.*, 2003). Outro estudo demonstrou, ainda, um aumento na expressão dos receptores A1 e A2A em amostras post mortem de córtex cerebral de portadores de DA tanto nos estágios iniciais quanto mais avançados da doença (Albasanz *et al.*, 2008). Por outro lado, tem sido relatada uma diminuição da expressão do receptor A1 no hipocampo em amostras *post mortem* de cérebro de pacientes com DA (Ułas *et al.*, 1993).

Embora o papel do A2A na neuroproteção em relação a DA não é bem estabelecido, alguns mecanismos têm sido propostos através de estudos com antagonistas desse receptor. Tem sido documentado na literatura que a cafeína é um antagonista dos receptores de adenosina, sendo um dos mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor associada ao consumo desta xantina com a DA. Dall´Igna e colaboradores (2009) demonstraram que cafeína foi capaz de reduzir a neurotoxicidade induzida pelo peptídeo Aβ em cultura de neurônios cerebelares de rato, sendo esse efeito neuroprotetor atribuído ao bloqueio dos receptores de adenosina A_{2A} e não dos receptores A_1. Corroborando esses achados, Arendash e colaboradores (2006) também demonstram que a administração de cafeína em um modelo animal transgênico para a DA foi capaz de melhorar a memória, diminuir os níveis peptídeo Aβ e diminuir a expressão de presenilina 1 e da enzima beta secretase. Entretanto, embora a densidade dos receptores A_1 e A_{2A} não tenha sido alterada em hipocampo e córtex cerebral, os níveis de adenosina foram restaurados pelo tratamento com cafeína nessa condição experimental (Arendask *et al.*, 2006). Resultados similares também foram descritos por Cao e colaboradores (2009), que relataram que a administração de cafeína melhorou a função cognitiva e causou uma redução nos níveis de peptídeo Aβ no cérebro e no plasma, além de uma redução na deposição do peptídeo Aβ cerebral em um modelo de DA (Cao *et al.*, 2009).

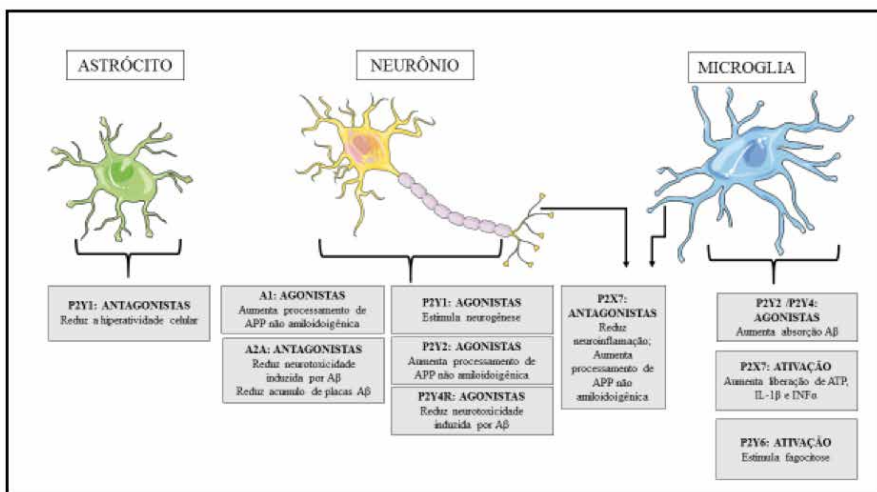
Além da cafeína, outros antagonistas do receptor A2A também têm sido avaliados em modelos experimentais de DA. Em um modelo triplo transgênico para a DA (3xTg-AD), o qual mimetiza várias características patológicas da doença, o bloqueio do receptor A_{2A} pelo antagonista SCH58261 foi capaz

de recuperar os déficits memória, a perda de proteínas sinápticas e a disfunção na plasticidade sináptica, comprovando, portanto, a hipótese da participação deste receptor de adenosina no desenvolvimento da DA (Silva *et al.*, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A DA é uma doença neurodegenerativa que afeta um número crescente de pessoas em todo mundo. A fisiopatologia da DA é complexa e até o presente momento ainda não tem cura. Muitos estudos vêm sendo exaustivamente realizados para esclarecer os mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na DA. Nos últimos anos, foi demonstrado que alterações em componentes do sistema purinérgico se associam ao desenvolvimento e à progressão da DA. A compreensão desses mecanismos, bem como a contribuição cada receptor purinérgico na patogênese dessa patologia debilitante, torna-se de extrema relevância e pode servir de base para o desenvolvimento de novas vias de intervenção terapêutica para retardar o início e a progressão da DA (Figura 1).

Figura 1: Receptores purinérgicos como alvos terapêuticos para a Doença de Alzheimer

Fonte: Woods *et al.* (2005) e Wojtczak *et al.* (2018) – adaptada.

REFERÊNCIAS

ALBASANZ, J. L.; PEREZ, S.; BARRACHINA, M.; FERRER, I.; MARTIN, M. Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. Brain Pathology, v. 18 (2), p. 211-210, 2008.

ALONSO ANDRÉS, P.; ALBASANZ, J., FERRER, I.; MARTIN, M. Purine related metabolites and their converting enzymes are altered in frontal, parietal and temporal cortex at early stages of Alzheimer's disease pathology. Brain Pathology, v. 28 (6), p. 933-946, 2018.

AGOSTINHO, P.; CUNHA, R. A.; OLIVEIRA, C. Neuroinflammation, oxidative stress and pathogenesis of Alzheimer's disease. Current Pharmaceutical Design, v. 16, p. 2766-2778, 2010.

ÂNGULO, E.; CASADO, V.; MALLOL, J.; CANELA, E.; VINALS, F.; FERRER, I.; LLUIS, C.; FRANCO, R. A1 adenosine receptors accumlate in neurodegenerative sctrutures in Alzheimer disease and mediated both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. Brain Pathology, v. 13, p. 440-451, 2010.

ARENDASH, G. W.; SCHLEIF, W.; REZAI-ZADEH, H.; JACKON, E.; ZACHARIA, L.; CRACCHIOLO, J.; SHIPPY, J.; TAN, J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β-amyloid production. Neuroscience, v. 142, n. 4, p. 941-952, 2006.

BEKRIS, L. M.; YU, C. E.; BIRD, T. D.; TSUANG, D. W. Genetics of Alzheimer disease. Journal Geriatric Psychiatry Neurology, v. 23(4), p. 213-227, 2010.

BOISON, D.; CHEN, J. F.; FREDHOLM, B. B. Adenosine signaling and function in glial cells. Cell Death Differentiation, v. 17 (7), p. 1071-1082, 2010.

BONAN, C. Ectonucleotidases and Nucleotide/Nucleoside Transporters as Pharmacological Targets for Neurological Disorders. CNS & Neurological Disorders – Drug Targets, v. 11, p. 739-750, 2012.

BURNSTOCK, G.; KRUGEL, U.; ABBRACHIO, M.; ILLES, P. Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. Progress in Neurobiology, v. 95 (2), p. 229-274, 2011.

CAO, C.; CIRRITO, J.; LIN, X.; WANG, L.; VERGES, D.; DICKSON, A.; MAMCARZ, M.; ZHANG, C.; MORI, T.; ARENDASH, G.; HOLTZMAN, D.; POTTER, H. Caffeine suppresses amyloid-β levels in plasma and brain of alzheimer's disease transgenic mice. Journal of Alzheimer's Disease, v. 17, n. 3, p. 681-697, 2009.

CERVELLATI, C.; WOOD, P. L.; ROMANI, A.; VALACCHI, G.; SQUERZANTI, M.; SANZ, J. M.; ORTOLANI, B.; ZULIANI, G. Oxidative challenge in Alzheimer's disease: state of knowledge and future needs. Journal Investigative Medicine, v. 64(1), p. 21-32, 2016.

CHEN, Y. G. Research Progress in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Chinese Medical Journal, v. 131 (13), p. 1618-1624, 2018.

CORREIA, S. C.; SANTOS, R. X.; SANTOS, M. S.; CASADESUS, G.; LAMANNA, J. C.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; MOREIRA, P. I. Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. Current Alzheimer Research, v. 10 (4), p. 406-419, 2013.

DALL´-IGNA, O.; PORCIUNCULA, L.; SOUZA, D.; CUNHA, R.; LARA, D. Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of β – amyloid neurotoxicity. British Journal of Pharmacology, v. 138 (7), p. 1207-1209, 2009.

DE LA MONTE, S. M.; TONG, M. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. Biochemical Pharmacology, v. 88 (4), p. 548-559, 2014.

DE OLIVEIRA, J.; ABDALLA, F., DORNELLES, G.; PALMA, T.; SIGNOR, C.; SILVA, B.; BALDISSARELLI, J.; DE OLIVEIRA, V.; CHITOLINA, M.; MORSCH, V.; RUBIN, M.; ANDRADE, C. Neuroprotective effects of berberine on recognition memory impairment, oxidative stress, and damage to the purinergic system in rats submitted to intracerebroventricular injection of streptozotocin. Psychopharmacology, v. 236 (2), p. 641-655, 2019.

DELEKATE, A.; FUCTEMEIER, M.; SCHUMACHER, T.; ULBRICH, C.; FODDIS, M.; PETZOLD, G.; Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. Nature Communications, v. 19 (5), 2014.

DIAZ-HERNANDEZ, J.; GOMEZ-VILLAFUERTES, R.; LÉON-OTEQUI, M., HONTECILHAS-PIETRO, L.; DEL PUERTO, A.; TREJO, L.; LUCAS, J.; GARRIDO, J.; GUALIX, J.; MIRAS-PORTUGAL, M.; DIAZ-HERNADEZ, M. In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3β and secretases. Neurobiology of Aging, v. 33 (8), p. 1816-1828, 2011.

DUSTER, R.; PROCKAERTS, J.; BLOKLAND, A. Purinergic signalling and hippocampal long-term potentiation. Current Neuropharmacology, v. 12 (1), p. 37-43, 2014.

ERB, L.; AJIT, D.; PETERSON, T.; WANG, Y.; CAMDEN, J.; GIBSON, W.; SUN, G.; ERB, L.; PERTIS, M.;WEISMANN, G. Nucleotides released from Aβ1-42-treated microglial cells increase cell migration and Aβ1-42 uptake through P2Y2 receptor activation. Journal of Neurochemistry, v. 121 (2), p. 228-238, 2012.

GRILL, J. D.; RAMAN, R.; ERNSTROM, K.; AISEN, P.; DOWSETT, S. A.; CHEN, Y.; LIU-SEIFERT, H.; HAKE, A. M.; MILLER, D. S.; DOODY, R. S.; HENLEY, D. B.; CUMMINGS, J. L. Comparing recruitment, retention, and safety reporting among geographic regions in multinational Alzheimer's disease clinical trials. Alzheimers Research Therapy, v. 7(39), p. 1-15, 2015.

GRIMM, A.; FRIEDLAND, K.; ECKERT, A. Mitochondrial dysfunction: the missing link between aging and sporadic Alzheimer's disease. Biogerontology, v. 17(2), p. 281-296, 2016.

GUTIERRES, J.; CARVALHO, F.; SCHETINGER, M.; RODRIGUES, M.; SCHMATZ, R.; PIMENTEL, V.; VIEIRA, J.; ROSA, M.; MARISCO, P.; RIBEIRO, D.; LEAL, C.; RUBIN, M.; MAZZANTI,

C.; SPANEVELLO, R. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. Life Sciences, v. 91 (23-24), p.1221-1228, 2012.

IDZKO, M.; FERRARI, D.; ELTZSCHIG, H. K. Nucleotide signalling during inflammation. Nature, v. 509 (7500), p. 310-317, 2014.

ILLES, P.; RUBINI, P.; HUANG, L.; TANG, Y. The P2X7 receptor: a new therapeutic target in Alzheimer's disease. Expert Opinion on Therapeutic Targets, v. 23, p. 165-176, 2019.

IZQUIERDO, I., BEVILAQUA, L.; ROSSATO, J.; BONINI, J.; DA SILVA, W., MEDINA, J.; CAMMAROTA, M. The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: A review of recent findings. Neurotoxicity Research, v. 10 (2), p. 113-121, 2009.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. Behavioural Pharmacology, v. 11 (7-8), p. 517-534, 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D.. Separate mechanisms for short- and long-term memory. Behavioural Brain Research, v. 103, p. 1-11, 1999.

JUNIOR, C.; FARIA, N. Memória. Psiciologia: reflexão e crítica, v. 28 (4), p. 780-789, 2015.

KONG, Q.; PETERSON, T.; BAKER, O.; STANLEY, E.; CAMDEN, J.; SEYE, C.; ERB, L.; SIMONYI, A.; WOOD, W.; SUN, G. Y.; WEISMAN, G. Interleukin-1beta enhances nucleotide-induced and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing in rat primary cortical neurons via up-regulation of the P2Y (2) receptor. Journal of Neurochemistry, v. 109 (5), p. 1300-1310, 2009.

LEE, H.; WON, S.; GWAG, B.; LEE, Y. Microglial P2X7 receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APPswe/PS1dE9 mouse model of alzheimer's disease. Experimental and Molecular Medicine, v. 43 (1) p. 7-14, 2011.

LI, H.; CHEN, C.; DOU, Y.; WU, H.; LIU, Y.; LOU, H.; ZHANG, J.; LI, X.; WHANG, H.; DUAN., S. P2Y4 receptor-mediated pinocytosis contributes to amyloid beta-induced self-uptake by microglia. Molecular and Cellular Biology, v. 33 (21), p. 4282-4293, 2013.

MARISCO, P.; CARVALHO, F.; ROSA, M.; GIRADI, B.; GUTIERRES, J.; JAQUES, J.; SALLA, A.; PIMENTEL, V.; SCHETINGER, M.; LEAL, D.; MELLO, C.; RUBIN, M. Piracetam prevents scopolamine-induced memory impairment and decrease of NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities. Neurochemical Research, v. 38 (8), p. 1704-1714, 2013.

MARTIN, E.; AMAR, M.; DALLE, C.; YOUSSEF, I.; BOUCHER, C.; LE DUIGOU, C.; BRUCKNER, M.; PROGENT, A.; SAZDOVITCH, V.; HALLE, A.; KANELLOPOULOS, J.; FONTAINE, B.; DELATOUR, B.; DELARASSE, C. New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. Molecular Psychiatry, v. 24 (1), p. 108-125, 2018.

MAYEUX, R.; STERN, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. Cold Spring Harbor Perspectives Medicine, v. 2(8), p. 1-18, 2012.

MCDOWELL, I. Alzheimer's disease: insights from epidemiology. Aging, v. 13(3), p. 143-162, 2001.

NOWRANGI, A.; LYKETSOS, C. G.; ROSENBERG, P. B. Principles and management of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's dementia. Alzheimer's Research Therapy, v. 7(1):12, 2015.

PARVATHENANI, L.; TERTYSHNIKOVA, S.; GRECCO, R.; ROBERTS, S.; ROBERTSON, B.; POSMANTUR, R. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Journal of Biological Chemistry, v. 278 (15), p. 13309-13317, 2003.

QIU, C.; KIVIPELTO, M.; VON STRAUSS, E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. Dialogues in Clinical Neuroscience, v. 11. p. 111-128, 2009.

RALEVIC, V; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacological Reviews, v. 50 (3) p. 413-492, 1998.

RASKIN, J.; CUMMINGS, J.; HARDY, J.; SCHUH, K.; DEAN, R. A. Neurobiology of Alzheimer's disease: integrated molecular, physiological, anatomical, biomarker, and cognitive dimensions. Current Alzheimer Research, v. 12(8), p. 712-722, 2015.

RATHBONE M. P., MIDDLEMISS P. J., GYSBERS J. W., CRAIG A., HERMAN M .A. R., REED J. K., CICCARELLI R., DI IORIO P., CACIAGLI F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. Progress Neurobiology, v. 59, p. 663-690, 1999.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Biochemistry Pharmacology, v. 88 (4), p. 640-651, 2014.

ROBSON, S.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signalling, v. 2 (2), p. 409-430, 2006.

ROSIM, E.; SILVA, I.; PERSIKE, D.; VIGNOLI, T.; FERENANDES, M. Adenosine and neuroprotection in the temporal lobe epilepsy: from A1 receptor activation to A2A receptor blockade. Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, v.16 (2), p. 64-67, 2010.

ROSZEK, K.; CZARNECKA, J. Is Ecto-nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase (NTPDase)-based Therapy of Central Nervous System Disorders Possible? Mini Reviewers in Medicinal Chemistry, v.15, p.5-20, 2015.

RYU, J. K.; MCLARNON, J. G. Block of purinergic P2X7 receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. NeuroReport, v.19, n. 17, p.1715-1719, 2008.

SCHELTENS, P., BLENNOW, K.; BRETELER, M.; DE STROOPER, B.; FRISONI, G.; SALLOWAY, S.; VAN DER FLIER. W. Alzheimer's disease. Lancet, v.30 (388), p. 505-517, 2016.

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine receptors and the central nervous system. Handbook Experimental Pharmacology, v. 193, p. 471-534, 2009.

SELKOE, D. J.; HARDY, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Molecular Medicine, v.8(6), p. 595-608, 2016.

SILVA, A.; LEMOS, C.; GONÇALVES, F.; PLIÁSSOVA, A.; MACHADO, N.; SILVA, H.; CANAS, P.; CUNHA, R.; LOPES, J.; AGOSTINHO, P. Blockade of adenosine A2A receptors recovers early deficits of memory and plasticity in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiology of Disease, v. 117, p. 72-81, 2018.

STONE, T. Adenosine, neurodegeneration and neuroproctetion. Neurological Resarch, v. 27 (2), p. 161-168, 2005.

STONE, T. W.; CERUTI, S.; ABBRACCHIO, M. P. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. Handbook of Experimental Pharmacology, v. 193, p. 535-87, 2009.

TAKENOUCHI, T.; SEKIYAMA, K.; SEKYGAWA, A.; FUJITA, M.;WARAGAY, M.; SUGAMA, S.; IWAMARU, Y.; KITANI, H.; HASHIMOTO, M. P2X7 receptor signaling pathway as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. Archives Immunology Therapy Experimental, v. 58 (2), p. 91-96, 2010.

UŁAS, J.; BRUNNER, L.; NGUYEN, L.; COTMAN, C. Reduced density of adenosine A1 receptors and preserved coupling of adenosine A1 receptors to G proteins in alzheimer Hippocampus: A quantitative autoradiographic study. Neuroscience, v. 52 (4) p. 843-854, 1993.

VARMA, R.; CHAY, Y.; TRONCOSO, J.; GU, J.; XING, H.; STOJILKOVIC, S.; MATTSON, M.; HAUGHEY, N. l. Amyloid-β induces a caspase-mediated cleavage of P2X4 to promote purinotoxicity. Neuromolecular Medicine, v. 11, n. 2, p. 63-75, 2009.

VOLONTE, C.; APOLLONI, S.; SKAPER, S.; BURSNSTOCK, G. P2X7 receptors: channels, pores and more. CNS & Neurological Disorders and Drug Target, v. 11 (6), p.705-721, 2012.

WENDT, S.; MARICOS, M.; VANA, N.; MEYER, N.; GUNEYKAYA, D.; SEMTNER, M.; KETTENMANN, H. Changes in phagocytosis and potassium channel activity in microglia of 5xFAD mice indicate alterations in purinergic signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, v.58, p.41-53, 2017.

WOODS, L.; AJIT, D.; CAMDEN, J.; ERB, L.; WEISMAN, G. Purinergic receptors as potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. Neuropharmacology, v.104, p.169-179, 2016.

YEGUTKIN, G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochimia et Biophysica Acta, v. 1783 (5), p. 673-694, 2008.

POSFÁCIO

Há quase 50 anos, acreditava-se que as moléculas de purinas eram apenas moedas energéticas das células e tinham pouco ou nenhum papel em mediar vias de sinalização nos diferentes territórios do organismo. Esta obra mostra, de forma clara e ampla, que essa ideia não é mais pertinente, uma vez que existe um verdadeiro conjunto de moléculas, enzimas e receptores que perfazem a sinalização purinérgica. O estudo destas vias, em que as purinas ganham um papel cada vez mais amplo, seja na modulação de processos fisiológicos ou/e patológicos, faz com que a sinalização purinérgica ganhe destaque no desenvolvimento do conhecimento científico.

Os componentes do sistema purinérgico são constituintes de todas as células e tecidos do organismo, podendo atuar nas mais distintas situações. Os nucleotídeos de adenina, mais especialmente o ATP e o ADP, bem como seu respectivo nucleosídeo, a adenosina, desempenham diversos papéis no desencadeamento e na progressão de variadas doenças por meio da sua sinalização via receptores P1 e P2. Nesse contexto, as enzimas responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos e nucleosídeos têm uma atuação fundamental no controle dos níveis extracelulares dessas moléculas e, consequentemente, no controle da ativação dos receptores purinérgicos.

Tendo em vista que a sinalização purinérgica está alterada em muitas condições patológicas, atualmente o estudo da modulação de componentes do sistema purinérgico tem sido amplamente empregado para desvendar novas possibilidades terapêuticas para algumas doenças, dentre as quais se destacam diferentes tipos de câncer. Dentre os componentes do sistema purinérgico, atualmente, modulações no receptor P2X7 aparecem como bastante promissoras no tratamento de alguns tipos de tumores malignos.

Os capítulos que constituem este livro evidenciam de forma detalhada que o sistema purinérgico desempenha papel fundamental: na modulação do sistema

imune e no controle da proliferação e apoptose celular; no desenvolvimento e na progressão do diabetes; na regulação da função tireoidiana; na regulação da interação de patógenos e hospedeiros; na regulação da função cardiovascular e renal; no entendimento de alterações mediadas pelo exercício físico e até na degeneração macular. Contudo, observam-se, ainda, muitas lacunas e algumas contradições na literatura, o que dificulta o estabelecimento de conclusões sobre determinados papéis de alguns componentes do sistema purinérgico em situações específicas. Além disso, a enorme miríade de regulações que esta via possui e o fato de as purinas estarem presentes em todas as células do organismo faz com que o entendimento do contexto fisiopatológico seja um processo bem delicado e de difícil interpretação.

Dessa forma, torna-se imprescindível o entendimento do sistema purinérgico não somente em células e tecidos específicos, mas bem como a conversa entre os tecidos por meio desse sistema. Isso só será possível promovendo o incentivo às pesquisas desenvolvidas nesse campo de conhecimento no entendimento dos processos fisiopatológicos. Ademais, como futuro promissor advindo do progresso destes estudos, a sinalização purinérgica tem o potencial de tornar-se um alvo efetivo para desenvolvimento de estratégias farmacológicas mais eficazes e seguras para os pacientes.

COLABORADORES

Aline Mânica
Graduada em Farmácia pela Universidade Comunitária da Região de Chapecó (Unochapecó). Especialista em Farmacologia Clínica, pela Universidade Comunitária da Região de Chapecó (Unochapecó). Mestre em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Ana Maria Oliveira Battastini
Graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Mestre em Bioquímica (UFRGS). Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Professora Titular aposentada, atuando como Docente Convidada no PPG Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. É uma das fundadoras do Clube Brasileiro de Purinas. Presidente do Clube, onde já atuou como Secretária-Geral, Conselheira e Vice-Presidente em todas as diretorias, desde a fundação, em 2009. Foi uma das primeiras pesquisadoras a caracterizar as NTPDases e investigado o papel dessas enzimas no sistema nervoso central.

Andréia Machado Cardoso
Graduada em Educação Física pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestre e doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela UFSM. Docente do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó. Docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da UFFS.

Celso Spada
Graduado em Farmácia-Bioquímica pela UFSC. Mestre e Doutor em Farmácia pela Universidade de São Paulo (USP). Professor Titular e Coordenador do Centro de Ciências da Saúde da UFSC – *Campus* Florianópolis.

Daniela Zanini
Graduada em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestre e Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (UFSM). Docente do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó. Docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da UFFS.

Débora Tavares de Resende e Silva
Graduada em Fisioterapia pela Universidade de Uberaba (UNIUBE). Mestre e doutora em Ciências da Saúde – Ênfase em Patologia pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Docente do curso de Medicina e de Enfermagem

da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó. Docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da UFFS.

Fabiana Fonseca Zanoelo
Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista (UNESP). Mestre e doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela USP-FFCLRRP. Docente responsável pela disciplina de Bioquímica para cursos da Graduação e Pós-Graduação na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) – *Campus* Campo Grande.

Gabriela Gonçalves de Oliveira
Graduada em Farmácia e Bioquímica. Especialista em Análises Clínicas. Mestre e Doutora em Patologia Experimental. Pós-Doutora em Bioquímica e Imunologia. Professora da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). Docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da UFFS.

Jeandre Augusto dos Santos Jaques
Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ). Mestre e doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Professor Adjunto responsável pela disciplina de Bioquímica ofertada a cursos de Graduação e Pós-Graduação na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) – *Campus* Campo Grande.

Jucimara Baldissarelli
Graduada em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestre e Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (UFSM). Pós-Doutoranda do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSM.

Leandro Henrique Manfredi
Graduado em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado) pela Universidade de São Paulo. Mestre e doutor em Ciências na área de Fisiologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Realizou parte de seu doutoramento no Singapore Institute for Clinical Science, em Singapura. Professor Adjunto da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó e docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da UFFS.

Maria Rosa Chitolina
Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Mestre em Bioquímica (UFRGS). Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Pós-Doutora junto ao Albert Einstein College em Medicine, em Nova York. Professora do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Bolsista 1B do CNPq. Desde 1988, trabalha com pesquisas envolvendo o sistema purinérgico.

Margarete Dulce Bagatini
Graduada em Farmácia – Análises Clínicas pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestre e Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (UFSM). Professora Adjunta da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). Líder do grupo de pesquisa "Estudos Biológicos e Clínicos em Patologias Humanas". Professora orientadora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da UFSM e Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFFS. Membro do Comitê Assessor de Pesquisa da UFFS. Docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da UFFS. Editora das revistas Journal of Immunology Research e Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Naiara Stefanello
Graduada em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestre e Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (UFSM).

Nathieli Bianchin Bottari
Graduada em Biomedicina pela Universidade Franciscana (UNIFRA). Mestre e Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Robson Coutinho-Silva
Doutor em Ciências Biológicas – Biofísica (1996) na UFRJ e Pós-Doutor pelo Royal Free and University College Medical School – Londres (2000-2012). Professor Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Formado em Física pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (1984). Cientista do Nosso Estado CNE/FAPERJ, chefe do laboratório de Imunofisiologia no IBCCF. Um dos primeiros pesquisadores em caracterizar os receptores purinérgicos em macrófagos, células dendríticas e células epiteliais.

Roberto Paes de Carvalho
Graduado em Medicina pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestre e Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica) pelo Instituto de Biofísica da UFRJ. Pós-Doutor na Johns Hopkins University, Estados Unidos (1987-1989). Pesquisador 2 do CNPq. Cientista do Nosso Estado FAPERJ. Professor titular do Departamento de Neurobiologia do Instituto de Biologia e chefe do Laboratório de Neurobiologia Celular do Programa de Neurociências da Universidade Federal Fluminense (UFF).

Roselia Maria Spanevello
Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Maria. Mestre em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Professora associada da Universidade

Federal de Pelotas (UFPel). Bolsista de produtividade em pesquisa (Nível 1D) do CNPq e orientadora no programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Lidera o grupo de pesquisa do CNPq "Aspectos bioquímicos em doenças crônico-degenerativas".

Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel
Bióloga, Mestre e Doutora em Ciências Biológicas: Genética, pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Professora da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – Campus Chapecó. Docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da UFFS.

Edgar Julian Paredes-Gamero
Graduado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário São Camilo. Mestre e doutor em Ciências: Biologia Molecular pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Beatriz da Silva Rosa Bonadiman
Graduada em Biomedicina pela Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC). Mestre em Farmacologia pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Doutoranda em Bioquímica pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Bruna de Barros Penteado
Graduada em Farmácia pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Mestre em Ciências Farmacêuticas pela UFMS. Desde 2014, desenvolve pesquisas envolvendo sinalização purinérgica e sistema colinérgico.

Cadieli Oliana Reichert
Graduada em Farmácia-Bioquímica e Mestre em Farmácia pela UFSC. Doutoranda em Ciências Médicas pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Charles Elias Assmann
Graduado em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado) pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestre e doutorando em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (UFSM).

Fernanda Cardoso Teixeira
Graduada em Farmácia pela Universidade Católica de Pelotas. Especialista em Oncologia, no Hospital Moinhos de Vento, em Análises Clínicas (LEAC), no Hospital São Francisco de Paula, e em Farmácia Estética, pelo Nepuga/POA. Mestre em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Doutoranda em Bioquímica e Bioprospecção da UFPel.

Filomena Marafon
Graduada em Biomedicina pela Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC). Mestre em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Doutoranda em Bioquímica (UFSC). Servidora técnica em laboratório/análises clínicas da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó.

Jorge Lúcio Rodrigues Júnior
Graduado em Educação Física pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Mestre em Ciências do Esporte (UFMG). Desde 2016, desenvolve pesquisas envolvendo a biomecânica do esporte e a fisiologia do exercício aplicada ao futebol.

Kamylla Fernanda Souza de Souza
Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Mestre em Ciências: Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Karine Paula Reichert
Graduada em Química (Licenciatura Plena) pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestre e doutoranda em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (UFSM).

Luciana Rocha Costa
Graduada em Enfermagem e Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). Desde 2017, desenvolve pesquisas envolvendo sinalização purinérgica.

Pauline da Costa
Graduada em Farmácia. Mestre e doutoranda em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela UFSM. Desde 2013, desenvolve pesquisas envolvendo a sinalização purinérgica.

Vanessa Valéria Miron
Graduada em Educação Física pela Faculdade Metodista de Santa Maria. Mestre e doutoranda em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Desde 2015, desenvolve pesquisas envolvendo a sinalização purinérgica.

Amauri de Oliveira
Acadêmico do 3º ano do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). Participante do Grupo de Pesquisa em Oncologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas em tumores hematológicos.

Ângelo Pereira de Lacerda
Graduando em Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó.

Édina Starck
Acadêmica do 3º ano do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). Participante do Grupo de Pesquisa em Oncologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas em tumores hematológicos.

Gabriela Nogueira Matschinski
Acadêmica do Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó.

Heitor Silvino Gonzaga
Graduando em Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó.

Hugo Falqueto
Graduado em Educação Física pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Graduando em Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó.

João Paulo Dal Magro Mocellin
Graduando em Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó.

Laura Nyland Jost
Graduanda em Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó. Desde 2018, desenvolve pesquisas envolvendo a sinalização purinérgica.

Mateus Barros Marra
Acadêmico do 3º ano do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó. Participante do Grupo de Pesquisa em doenças cardiovasculares. Linha de pesquisa: Hipertensão, aterosclerose e sistema purinérgico.

Matheus Pelinski da Silveira
Graduando em Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó.

Matheus Ribeiro Bizuti
Graduando em Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó. Desde 2018, desenvolve pesquisas envolvendo a sinalização purinérgica.

Maria Luiza Mukai Franciosi
Graduanda em Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS).

Marta Schmidt Pfaffenzeller
Graduanda em medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS).

Tamíres Hillesheim Mittelmann
Acadêmica do Curso de Medicina e Monitora da Disciplina de Anatomia Humana da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó.

Reitoria

Reitor	Marcelo Recktenvald
Vice-Reitor	Gismael Francisco Perin
Chefe do Gabinete do Reitor	Rafael Santin Scheffer
Pró-Reitora de Administração e Infraestrutura	Rosangela Frassão Bonfanti
Pró-Reitor de Assuntos Estudantis	Rubens Fey
Pró-Reitor de Gestão de Pessoas	Claunir Pavan
Pró-Reitora de Extensão e Cultura	Patricia Romagnolli
Pró-Reitor de Graduação	Jeferson Saccol Ferreira
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação	Clevison Luiz Giacobbo
Pró-Reitor de Planejamento	Everton Miguel da Silva Loreto
Secretário Especial de Laboratórios	Edson da silva
Secretário Especial de Obras	Fábio Correa Gasparetto
Secretário Especial de Tecnologia e Informação	Ronaldo Antonio Breda
Procurador-Chefe	Rosano Augusto Kammers
Diretor do Campus Cerro Largo	Bruno Munchen Wenzel
Diretor do Campus Chapecó	Roberto Mauro Dall'Agnol
Diretor do Campus Erechim	Luís Fernando Santos Corrêa da Silva
Diretor do Campus Laranjeiras do Sul	Martinho Machado Júnior
Diretor do Campus Passo Fundo	Julio César Stobbe
Diretor do Campus Realeza	Marcos Antônio Beal

Chefe do Departamento de Publicações Editoriais	Demétrio Alves Paz
Assistente em Administração	Fabiane Pedroso da Silva Sulsbach
Revisora de textos	Marlei Maria Diedrich

Revisão dos textos
Autores

Preparação e revisão final
Marlei Maria Diedrich

Projeto Gráfico
Mariah Carraro Smaniotto

Diagramação
COMUNICA (Agência de Comunicação EIRELI)

Criação da capa:
Leandro Henrique Manfredi e
Maria Luiza Mukai Franciosi

Finalização da capa:
Mariah Carraro Smaniotto

Divulgação
Diretoria de Comunicação Social

Formato do e-book
e-Pub, Mobi e PDF

S615 Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas / organizadores Andréia Machado Cardoso, Leandro Henrique Manfredi, Sara Franco Vieira de Oliveira Maciel. – Chapecó : Ed. UFFS, 2021. – il.

ISBN: 978-65-86545-47-0 (PDF)
978-65-86545-48-7 (Mobi)
978-65-86545-49-4 (e-pub)

1. Sistema purinérgico - Nucleotídeos 2. Fisiologia humana - condições fisiológicas 3. Patologias I. Cardoso, Andréia Machado (org.) II. Manfredi, Leandro Henrique (org.) III. Maciel, Sara Franco Vieira de Oliveira (org.)

CDD: 612

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Bibliotecas – UFFS
Arilthon Romulo Cavalcante Casimiro
CRB - 1/3376